



# МНОГООСНАЯ ГОНИОМЕТРИЧЕСКАЯ 3D-ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ВЕКТОРНЫХ ДИАГРАММ ОПТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КОЛЛОИДНЫХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СТРУКТУР НА ЧИПЕ НА РАЗЛИЧНЫХ ТРАЕКТОРИЯХ И РЕЖИМАХ ЛАЗЕРНОГО СКАНИРОВАНИЯ

О. В. Градов, В. В. Крюковских, Ф. А. Насиров,  
А. Г. Яблоков,

Лаборатория биологического воздействия нано-  
структур

Институт Энергетических Проблем Химической  
Физики им. В. Л. Тальрозе РАН, gradov@center.chph.  
ras.ru, Москва, Россия

В экспериментальных условиях индикатрисы  
рассеяния естественных клеток отличаются  
от теоретических индикатрис рассеяния частиц  
идеализированной формы. Это отличие является  
ключевым параметром при визуализации  
характеристик клеток, который дает достаточно  
ценную информацию о структуре образца. Целью  
настоящей публикации является демонстрация  
результатов анализа и 3D-визуализации диаграмм  
направленности, оптических индикатрис  
многоосных угловых геометрий эксперимента  
на разных траекториях и режимах сканирования  
образца, выполненных на семействе установок  
безлинзовой микроскопии биологических  
препараторов с угловым разрешением "Кватернион".  
Установки разработаны коллективом авторов  
в рамках двухлетнего гранта РФФИ в период с 2016  
по 2017 год.

## ВВЕДЕНИЕ

Угловые зависимости оптических характеристик  
биологических структур с позиций биофизики  
могут быть рассмотрены как коррелят их ультра-  
морфологии (ультраморфология – субклеточная  
морфология). В силу этого они могут использо-

# MULTI-AXIS GONIOMETRIC 3D- VISUALIZATION OF VECTOR DIAGRAMS OF OPTICAL CHARACTERISTICS OF DISPERSED AND BIOLOGICAL STRUCTURES ON A CHIP USING DIFFERENT LASER SCANNING REGIMES & TRAJECTORIES

O. V. Gradov, V. V. Krukowskikh, P. A. Nasirov,

A. G. Jablokov,

Laboratory of biological effects of nanostructures,

INEPCP RAS, gradov@center.chph.ras.ru

Moscow, Russia

Under experimental conditions, the indicatrices  
of the scattering of natural cells differ from the  
theoretical indicatrix of scattering of particles of an  
idealized form. This difference is a key parameter  
that help to visualizing the characteristics of cells,  
which provides valuable information about the  
structure of the sample. The aim of this publication  
is to illustrate the results of the analysis and the  
volume rendering of the visual patterns of radiation  
patterns or optical indicatrix in the multi-axis  
geometries of the experiments at different scanning  
trajectories and speed regimes. Such methods may  
be implemented on the "Quaternion"-type setups  
for lens-free imaging of biological structures with  
angular resolution. This setup family has been  
assembled in 2016–2017 by our group and the work is  
supported by RFBR (Project No. 16-32-00914).

## INTRODUCTION

The angular dependence of the optical  
characteristics of biological structures in terms of  
biophysics may be considered as a correlate of their  
ultramorphology, whereby physical descriptors of  
cells and subcellular structures correlated can be  
used as the key ones simultaneously correlated  
with ultrastructural (which is identical to  
nanostructured) characteristics of cells, and colloid  
or in general, dispersed physical characteristics of  
biological media.



ваться как ключевые физические дескрипторы клеток и субклеточных структур, соотносимые одновременно с ультраструктурными (что тождественно –nanoструктурными) особенностями клеток, а также коллоидными или в общем случае дисперсными физическими характеристиками биологических сред.

Угловая зависимость интенсивности рассеяния света (индикатриса) представляет, с точки зрения поляризационно-небелометрического анализа и цитометрического определения типов клеток, наиболее комплексный дескриптор их идентификации, основанный на индивидуальных свойствах рассеивающих излучение частиц [1]. В экспериментальных условиях естественные клетки обладают существенными для геометрической (следовательно, морфологической) идентификации отклонениями в индикатрисах рассеяния от аппроксимации частицами идеализированной формы с индикатрисами рассеяния, вычисленными на основе теории Ми, метода Т-матриц или дискретных диполей. Эти отклонения (или невязки аппроксимации) являются также дескрипторами характеристик клетки, помимо морфологии клетки. Исходя из анализа индикатрисы, можно характеризовать комплементарные дескрипторы. К их числу, в частности, относятся показатель преломления и коэффициент поглощения, размер, а также поляризация/деполяризация пучка излучения [2,3] в клеточной микросреде. На базе комплекса этих параметров можно произвести достаточно полную классификацию частиц/клеток [4,5].

Смысл термина "комплементарный дескриптор" в данном случае следует трактовать как получение неразделимых по физическим критериям параметров в рамках единого эксперимента на одиночных идентифицируемых частичках/клетках. По результатам эксперимента регистрируется и картируется (в смысле, адекватном английскому термину "мапинг" – отображение онтологий) то или иное классификационное множество. При этом оно взаимно-однозначно сопоставляется носителям данных свойств, позволяя отнести его к тому или иному семейству клеток/ частичек. Клетка/частичка определяется не каким-либо одним параметром, а совокупностью параметров (то, что в топологии называется "тогда и только тогда, когда" или "когда" все точки принадлежат данному множеству).

Естественно, индикатриса может строиться не только для рассеяния пучка на клеточной структуре, но и для отражения [6] – равно

The angular dependence of the intensity of light scattering (indicatrix) represents, in terms of polarization and nephelometric analysis and cytometric determination of cell types, the most complex descriptor of their identification, based on the individual properties of radiation-scattering particles [1]. In the experimental conditions, the natural cells have deviations (essential for the geometrical (and hence morphological) identification) in the scattering indicatrices from approximation by the idealized- shape particles with scattering indicatrices, computable based on Mie theory, T-matrix method or discrete dipoles. These deviations (or approximation disparities) are also the descriptors of the cell characteristics, in addition to the cell morphology. Proceeding from the indicatrix analysis, it is possible to characterize complementary descriptors, which include, in particular, the refractive index and the absorption coefficient, size, as well as the polarization/ depolarization of the radiation beam [2,3] in the cellular microenvironment, based on the complex of which a relatively complete classification of particles/cells can be made [4, 5].

The meaning of the term "complementary descriptor" in this case should be interpreted as the receipt of the parameters, non-separable by physical criteria, in a single experiment on single identifiable particles/cells, the results of which are used to record and map ("mapping" – ontology matching) any given classification set in a one-to-one correspondence with the carriers of these properties, the assignment to which of any given cell/particle is determined not by any of these settings, but rather by a set of data parameters (as it is referred in the topology "if and only if" or "when" all points belong to a given set).

Naturally, the indicatrix can be plotted not only for beam scattering on the cellular structure, but also for reflection [6], as well as the scattering indicatrix can be fixed or calculated using reflection factor references [7]. The concept of relative scattering indicatrix [8] allows us to extend the concept of indicatrix to any formats of measuring radiation, reflection, transmission and scattering. Currently, not only abroad, but also in Russia, the term "fluorescence indicatrix" is used in a standard way [9].

In a certain approximation, it is possible to compare the indicatrices of optical characteristics to radiation patterns in radioelectronics (or the corresponding projection of directograms in the physics of radio waves propagation), determining



как и индикатриса рассеяния может фиксироваться или вычисляться с использованием эталонов коэффициента отражения [7]. Понятие относительной индикатрисы рассеяния (relative scattering indicatrix) [8] позволяет распространить понятие индикатрисы на любые форматы измерений излучения, отражения, пропускания и рассеяния. В настоящее время не только за рубежом, но и в России стандартно используется термин "индикатрисы флуоресценции" [9].

В некотором приближении можно сопоставить индикатрисы оптических характеристик диаграммам направленности в радиоэлектронике (либо соответствующей проекции директограмм в физике распространения радиоволн). Индикатрису можно определить как функцию, представляющую пространственное (в идеале – в объеме, а не на планарной проекции) распределение интенсивности излучения на выходе исследуемого образца. Это распределение представляется в форме векторной диаграммы, в которой радиус-векторов интенсивности характеризуется длиной и направлением картирования с заданными угловыми координатами (например – в кватернионной форме или углах Эйлера). В таком случае фундаментальное значение для анализа и фасетной классификации или идентификации (фингерпринтинга) клеток в этих координатах может играть не только угловое распределение рассеянного клеткой излучения, но и угловые и поляризационные особенности собственного излучения окрашенной или содержащей нативные хромофоры клетки. Предельным случаем данной задачи будет практически когерентное распространение излучения белков с флуоресцентными свойствами, таких как GFP (зеленый флуоресцентный белок) [10,11], в клетке при наносекундной накачке. Следует различать его с противоположным случаем, когда имеет место нормальное распределение интенсивности излучения – это свойственно явлению биолюминесценции, возникающей вне условий импульсной накачки. Такой результат свойственен обычной люминесцентной микроскопии [12].

В связи с этим существенное значение для всех методов, использующих в качестве метрологического калибровочного сигнала угловые распределения оптических параметров, является адекватность геометрии сканирования ("гониометрического оптического тракта") диаграмме направленности на выходе образца. В цитосчетчиках для этого обычно используют несколько способов. Один из них – редукция числа пози-

the indicatrix as a function, determining the spatial (ideally, in volume, not in planar projection) radiation intensity distribution at the output of the studied sample, represented in the form of a vector diagram with a proportionality of the radius-vectors of parameter intensity in the mapping direction with given angular coordinates (e.g., in quaternion form or Euler angles). In this case, the fundamental value for the analysis and facet classification or identification (fingerprinting) of cells in these coordinates can be expressed not only by the angular distribution of the radiation scattered by the cell, but also by the angular and polarization features of the intrinsic radiation of a stained cell or containing native chromophores cell. The limiting case of this problem will be the practically coherent propagation of radiation of proteins with fluorescent properties, such as GFP (green fluorescent protein) [10, 11], in a cell under nanosecond pumping; the opposite case is the normal distribution of bioluminescence beyond the conditions of pulsed pumping, which is inherent in the results of conventional fluorescence microscopy [12].

In this connection, the adequacy of the scanning geometry ("goniometric optical path") to radiation pattern at the sample exit is essential for all methods using the angular distribution of optical parameters as a metrological signal. In cell counters, this usually involves either reducing the number of data collection positions up to two positions, which is fraught with loss of the main array of relevant information, or detectors on a rotating optomechanical/mechatronic lock, which gives the problem of non-synchronous scanning (sometimes leading to the impossibility of comparison and colocalization of measurement data in a multi-angle rendering of a non-stationary particle/cell), or discrete arrays of detectors that give a discrete display of descriptors, both in angular and spatial coordinates. Despite the importance of this problem (since the angular position of the minima gives the possibility of calculating the properties of particles/cells along with the ratiometric indices of intensities at the angles of the maximum and minimum), it has not been satisfactorily solved to the present time, since, usually, the proposed constructive solutions have a palliative nature, worsening certain target technical characteristics while improving others. There are no solutions for scanning trajectories of complex shapes, such as surfaces of the third order, as well as for displacements in non-standard coordinate systems, as shown by deep automated bibliographic analysis;



ций сбора данных (вплоть до двух позиций, что чревато потерей основного массива релевантной информации). Другой – применение детекторов на вращающемся оптомеханическом/мехатронном фиксаторе (что создает проблему несинхронного сканирования, ведущую иногда к невозможности сопоставления и колокализации данных измерений при многоугловом рендеринге нестационарной частицы/клетки). Следующий способ – использование дискретных массивов детекторов, дающих дискретное, как по угловым, так и по пространственным координатам, отображение дескрипторов. Задача эта важна, так как угловое положение минимумов дает в подобных методах (наряду с рациометрическими показателями интенсивностей на углах максимума и минимума), возможность вычисления свойств частиц/клеток). Однако несмотря на ее важность, до настоящего времени она остается неудовлетворительно решенной. Причина кроется в том, что в основной массе предлагаемые конструктивные решения имеют паллиативный – ухудшающий одни целевые технические характеристики при улучшении других – характер. Для траекторий сканирования сложной формы, таких как поверхности третьего порядка, а также перемещений в нестандартных системах координат, как показывает глубинный автоматизированный библиографический анализ, решений нет. Более того, даже в работах, где следовало бы осуществлять согласованное (по геометрии образца) сканирование, такой задачи, как правило, не ставится. В итоге упускается качественно новый пласт данных, представляющий собой уникальные в комплексе дескрипторы, взаимно-однозначно сопоставляемые с геометрией того или иного образца (морфизмы, в терминологии теории категорий), проецируемые на его геометрию, вследствие чего характеризующие его с позиционной и угловой чувствительностью.

Надо сказать, что трехмерные фотометрические индикатрисы используются уже с 1970-х годов [13] для характеристики удаленных объектов и учитываются в методах оптической триангуляции [14]. Радиационный, в том числе ковективно-лучистый, перенос тепла в объеме микрогетерогенной среды вычисляется только с использованием индикатрис, имеющих соответствующую метрику [15], для чего может использоваться техника трехмерного анализа на индикатрисах [16]. С 1960-х годов известны решения уравнения переноса излучения для индикатрис рассеяния, сильно отличающихся

moreover, even in the researches where a consistent scanning (according to the geometry of the sample) should be performed, this problem is not usually posed. As a result, a qualitatively new layer of data is missing, representing descriptors unique in the complex that are one-to-one comparable with the geometry of a given sample (morphisms, in the terminology of the category theory) projected onto its geometry, thereby characterizing it with positional and angular sensitivity.

It should be mentioned that three-dimensional photometric indicatrices have been used since the 1970s [13] for the characterization of remote objects and are taken into account in the methods of optical triangulation [14]. Radiation, including convective-radiant, heat transfer in the volume of a microheterogeneous medium is calculated only using indicatrices having a corresponding metric [15], for which the technique of three-dimensional analysis on indicatrices can be used [16]. Since the 1960s, the solutions of the radiation transfer equation for the scattering indicatrix, which is very different from the spherical one, are known [17]. However, most authors try to reduce the geometry of model systems to a spherical form, based on the computational features of the solution of the inverse problem, at least in the first approximation [18–23]. The scattering indicatrices of ellipsoidal and spheroidal (ellipsoid of revolution) particles, which degenerate into a sphere when all three semi-axes are equal are considered less frequently [24, 25]; even more rarely, cylindrical particles in the Wentzel-Kramers-Brillouin [26] or Rayleigh-Hans-Debye [27, 28] approximations; the studies on particles of the toroidal (and more complex) form are individual and exotic [29]. In this case, as a rule, the geometry of the particle is taken into account, but the possible scanning geometry of the given experiment is not included in the calculation, which quite significantly limits the nomenclature of possible particle geometries. A paradox of the optimality of hematological analyzers is known which consists in the fact that in using a standard system analyzing the scattering of radiation in two solid angles ( $2\text{--}6^\circ$ ,  $8\text{--}15^\circ$  of the polar angle), the hematological analyzer is not optimal for measuring normal red blood cells, but is suitable for measurements of the parameters of the spherical erythrocytes [30], i.e. the cells different from the native form that arise either in the process of sample preparation (spherizing with preservation of volume by the Kim-Ornstein method) or as a consequence of anomaly (spherocytosis associated with defects in the



от сферической [17]. Однако геометрии модельных систем, исходя из вычислительных особенностей решения обратной задачи, большинство авторов, по крайней мере, в первом приближении, пытается свести к сферической форме [18–23]. Реже рассматриваются индикатрисы рассеяния эллипсоидальных и сфериодальных (эллипсоид вращения) частиц, вырождающихся в сферу, когда все три полуоси равны [24,25]; еще реже – цилиндрических частиц – в приближениях Вентцеля-Крамерса-Бриллюэна [26] или Рэлея-Ганса-Дебая [27,28]; единичный и экзотический характер носят работы по частицам тороидальной (и более сложной) формы [29]. При этом, как правило, учитывается геометрия частицы, но не входит в расчет возможная геометрия сканирования данного эксперимента, что довольно существенно ограничивает номенклатуру возможных геометрий частиц. Известен парадокс оптимальности гематологических анализаторов, заключающийся в том, что при использовании стандартных систем, анализирующих рассеяние излучения в два телесных угла ( $2\text{--}6^\circ$ ;  $8\text{--}15^\circ$  полярного угла), гематологический анализатор не является оптимальным для измерения нормальных эритроцитов, но подходит для измерения параметров сферизованных эритроцитов [30], то есть клеток, отличной от нативной формы, возникающих либо в процессе пробоподготовки (сферизация с сохранением объема методом Кима-Орнштейна), либо как следствие патологии с расплывчатой этиологией (сфeroцитоз, связанный с дефектами гликолитического пути и дефицитом АТФ; наследственный сфeroцитоз, связанный с потерей части мембранных липидов; реактивные сфeroцитозы при медикаментозном окислении сульфигидрильных групп; пароксизмальная ночная гемоглобинурия; деградация мембраны и потеря телец Гейнца при прохождении эритроцитов через селезенку, а также травмы эритроцитов при столкновениях с внутрисудистым фибрином). В результате этого эвристическая/диагностическая ценность результатов подобных цитометрических измерений критически понижается. Следовательно, необходима принципиально новая техника измерений и визуализации биологических структур и паттернов взаимодействующего с ними излучения при различных траекториях и угловых режимах сканирования, дающая возможность компенсировать дефекты и возможные артефакты с учетом изменения интенсивности сигнала на всех углах скана биологического образца.

glycolytic pathway and ATP deficiency; hereditary spherocytosis associated with the loss of a portion of the membrane lipids; reactive spherocytosis with drug oxidation of sulphydryl groups; paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; membrane degradation and loss of Heinz's bodies when red blood cells pass through the spleen, as well as erythrocyte injury in collisions with intravascular fibrin). As a result, the heuristic/diagnostic value of the results of these cytometric measurements is critically reduced. Therefore, a fundamentally new technique for measuring and rendering biological structures and patterns of interacting radiation with different trajectories and angular scanning modes is needed, allowing for compensation of defects and possible artifacts, knowing the change in signal intensity at all scanning angles of a biological sample.

## MATERIALS AND METHODS

The aim of this publication is to illustrate the results of the analysis and the volume rendering of the visual patterns of radiation patterns or optical indicatrix in the multi-axis geometries of the experiments at different scanning trajectories and speed regimes. Such methods may be implemented on the "Quaternion"-type setups for lens-free imaging of biological structures with angular resolution. This setup family has been assembled in 2016–2017 by our group and the work is supported by RFBR. Measurements in spherical geometry were carried out on a five-axis system similar to that described in [31] for rendering in the coordinates adequate to the sphere, even though the cells in the sample could be of arbitrary shape [32]. If in the standard methods of analyzing the particle size distributions according to scattering indicatrices the measurements were made in the presence of speckle/speckle noise [33], then for this type of instrument, the speckle was also an informative signal. The rendering algorithm was based on obtaining a gradient map of the laser beam signal before and after passing through the biological sample. Indicatrices/radiation patterns were obtained by extrusion of the isophotes from the surface of the coordinate projection grid to a radius-vector proportional to the intensity of the signal (according to the definition given in the introduction). As a source of coherent radiation, DPSS (diode-pumped solid-state laser) was used to scan the yttrium orthovanadate crystal with an NIR diode ( $\lambda = 808 \text{ nm}$ ); in this case, the doubling of the orthovanadate frequency ( $\lambda = 1064 \text{ nm}$ ) occurred on KTP ( $\text{KTiOPO}_4$ ), resulting in the scanner output beam with  $\lambda = 532 \text{ nm}$ . Scanning at different speeds

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Целью настоящей публикации является демонстрация результатов анализа и 3D-визуализации диаграмм направленности, оптических индикатрис многоосных угловых геометрий эксперимента на разных траекториях и режимах сканирования образца, имплементированных на семействе установок безлинзовой микроскопии биологических препаратов с угловым разрешением "Кватернион", разработанных коллективом авторов в рамках двухлетнего гранта РФФИ в период с 2016 по 2017 год. Измерения в сферической геометрии велись на пятиосной системе, подобной описанной нами в работе [31], при визуализации в координатах, адекватных сфере, несмотря на то, что клетки в образце могли быть произвольной формы [32]. Если в стандартных методах анализа распределений размеров частиц по индикатрисам рассеяния измерения велись в присутствии спеклов/спекл-шумов [33], то для данного типа приборов спекл являлся также информативным сигналом. Алгоритм визуализации базировался на получении карты градиента сигнала лазерного пучка до и после прохождения через биологический образец. Индикатрисы/диаграммы направленности получались путем экструзии изофот с поверхности координатной проекционной сетки на радиус-вектор, пропорциональный интенсивности сигнала (согласно данному во введении определению).

В качестве источника когерентного излучения при сканировании использовали DPSS (твердотельный лазер с диодной накачкой) с накачкой кристалла ортovanадата иттрия NIR-диодом ( $\lambda=808$  нм). При этом удвоение частоты излучения ортovanадата ( $\lambda=1064$  нм) происходило на КТР (КТ $i$ ОРО4), в результате чего выходной луч сканера имел  $\lambda=532$  нм. Производили сканирование на разных скоростях и физических траекториях, соблюдая условие полного прохода геометрии образца и поверхности проекции за время получения кадра на КМОП-чипе – за исключением получения импульсных характеристик на фиксированной точке проекции (как это показано на рис. 1). Впоследствии производили визуализацию в цилиндрических координатах и для топологического сравнения – на торе.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

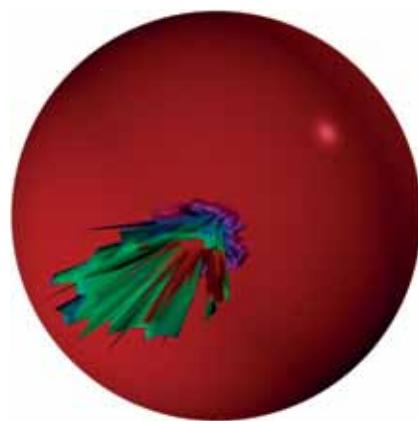
На рис. 1 приведен опорный спекл-вычитенный (контрастированный) сигнал, характеризующий позицию лазерного пучка на сфере с угловой проекции в некий произвольный момент време-

и и физические траектории был выполнен, наблюдая за состоянием полного прохода геометрии образца и поверхности проекции в течение времени получения кадра на КМОП-чипе, кроме того, для получения импульсных характеристик на фиксированной точке проекции (как это показано на рис. 1). Затем производилась визуализация в цилиндрических координатах и для топологического сравнения – на торе.

## RESULTS

Fig. 1 shows a reference speckle-subtracted (contrasted) signal that characterizes the position of the laser beam on the sphere from the angular projection at some arbitrary time point without the preparation. The sweep of this beam during the scanning gives the projection of the sample. An example of an analysis of a calibration dispersion medium on a chip with a projection to the hemisphere is shown in Fig. 2, which demonstrates the noise of diffuse scattering on the sample particles. The more the system is coarsely dispersed, the more pronounced its component (blue and violet) is different from the background (i.e. red) shade, as can be seen in Fig. 3.

By introducing a rather clearly localized cellular structure on the projected chip (here – a fragmented biopsy sample), one can observe a localized response in the regions correlated with this structure (violet part of the projection on the RGB map in the pseudo colors in Fig. 4). A similar pattern is observed for other scanning trajectories and in other



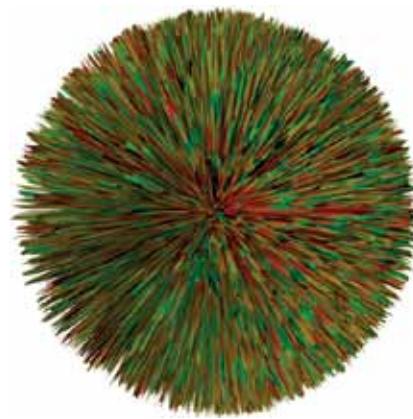
**Рис. 1.** Опорный спекл-вычитенный (контрастированный) мгновенный импульсный сигнал, характеризующий позицию лазерного пучка на сфере

**Fig. 1.** Reference speckle-subtracted (contrasted) instantaneous pulse signal characterizing the position of the laser beam on the sphere

мени при отсутствующем препарате. Развертка данного пучка при сканировании дает проекцию образца. Пример анализа калибровочной дисперсной среды на чипе с проекцией на полу-сферу приведен на рис. 2, который демонстрирует шум диффузного рассеяния на частицах образца. Чем более грубо-дисперсная система – тем более выражена ее отличная от фонового (т. е. красного) оттенка составляющая (синяя и фиолетовая), как можно видеть на рис. 3.

Вводя на проецируемый чип довольно четко локализованную клеточную структуру (здесь – фрагментированный образец биопсии), можно наблюдать локализованный отклик в областях, соотносимых с этой структурой (сиренево окрашенная часть проекции на RGB-карте в псевдоцветах на рис. 4). Аналогичная картина наблюдается и при других траекториях сканирования, и в других координатах (цилиндрических – как контрадикторный пример, поскольку альтернативное использование сферических и цилиндрических координат, равно как и альтернативное описание в переменных Эйлера или Лагранжа в теории вращающихся оптических источников, как пример которых могут быть рассмотрены звезды, анализируемые по их спектрам, является классическим для сопоставления подобных техник). Так, на рис. 5 и 6 приводятся реконструкции для калибровочных гетерогенно-дисперсных систем, сферические проекции которых даны на рис. 2 и 3 соответственно. Соответствующий формат визуализации для фрагментированного образца биопсии приведен на рис. 7. Как можно видеть, сферическая и цилиндрическая проекции дают достаточно ценную информацию о структуре образца.

Цели измерений легко визуализируются и поддаются машинному опознанию (при применении программных средств машинного обучения стереометрической идентификации структур) после фильтрации диффузного/дисперсионного шума на сферических и цилиндрических проекциях. Существенно менее оптимистично решение (с позиций идентификации) проблемы идентификации на торе, так как появляется пересечение лучей и кросс-зашумление каналов. Зачастую трехмерные лучевые визуализации, подобные показанным на рис. 2–7, являются эвристически бессмысленными и ничего не говорящими о природе образца, в силу топологических причин, когда часть проекции с образца оказывается внутри тора. Это же приводит к ошибкам в процессе калибровки, когда калибровка ведется



**Рис. 2.** Визуализация структуры рассеяния для мелкодисперсной калибровочной смеси (преобладают субмикронные частицы). Сферическая геометрия проекции  
**Fig. 2.** Rendering of the scattering structure for a finely dispersed calibration mixture (submicron particles predominate). Spherical geometry of the projection.

coordinates (cylindrical as a contradictory example, since the alternative use of spherical and cylindrical coordinates, as well as an alternative description in the Euler or Lagrange variables in the theory of rotating optical sources, e.g. stars, analyzed by their speckles, is a classic for comparing similar techniques). Thus, Fig. 5 and 6 show reconstructions for gauge heterogeneous-disperse systems, the



**Рис. 3.** Визуализация структуры рассеяния для грубо-дисперсной калибровочной смеси (в наличии также микронные и декамикронные в шлейфах распределений частицы). Сферическая геометрия проекции  
**Fig. 3.** Rendering of the scattering structure for the coarsely dispersed calibration mixture (in the presence of micron and decamicron particles in the trails of distributions). Spherical geometry of the projection.

по ложно-отрицательному фону, а наличие в нем не визуализированных структур не учитывается. Можно показать с достаточной точностью этот эффект на моделях. На рис. 8-а показан паттерн для гетеродисперсной среды с равномерной седиментацией в торoidalной проекции. На рис. 8-б показан проецированный на тор паттерн локализованного образца (та же нотация псевдоцветов, что и на рис. 4, рис. 7). А на рис. 8-с, который можно было в данной проекции принять за абсолютный ноль калибровки, тот же образец фрагментированной биопсии, но меньшего размера и смещенный (в пространстве регистрирующей камеры).

Так как трехмерный рендеринг занимает существенное машинное время, для просмотра с масштабированием и вращением внутренних проекций на торе он не оптимален при калибровке в условиях быстрого эксперимента на живых клетках, осаждающихся коллоидах и т. д. Поэтому, чтобы избежать ошибок оператора, мы не можем признать торoidalные проекции столь же эвристически ценными, как и сферические или цилиндрические. В итоговое (готовящееся для биоколлоидной химии и лазерной биофизики) программное обеспечение визуализация на торе не интегрировано по этой причине.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, создана многоугловая система сканирующего картирования биологических образцов в различных геометриях, качественно отличающаяся как от дифракционных структурометров прошлого [34], регистрировавших структуры с помощью индикаторов рассеяния, так и от современных устройств для измерений частиц в нанодиапазоне [35], прежде всего геометрией проекции и размерностью визуализации. Необходимо отметить, что стереометрические установки семейства "Кватернион" не идентичны стандартным 3D-сканерам диаграмм направленности лазерного излучения [36,37], поскольку анализируют параметры образцов (клеток, коллоидных частиц), а не собственно пучка, используемого только в калибровке с последующим вычитанием профиля или в спектрально-посредованных методах анализа биологических структур на чипе, что, однако, не исключает потребности данного типа установок в лазерах со стабильно сканирующей диаграммой направленности [38] или использовании специализированных акусто-оптических дефлекторов для обеспечения сканирования. Имеющиеся know-how позволяют орга-



**Рис. 4.** Локализованный четко дифференцированный (сиренево окрашенная часть проекции) от фона (красный) и диффузного шума (желтый) паттерн клеточной структуры (фрагментированного образца биопсии). Сферическая геометрия проекции  
**Fig. 4.** Localized clearly differentiated (violet part of the projection) from the background (red) and diffuse noise (yellow) pattern of the cell structure (fragmented biopsy specimen). Spherical geometry of the projection.

spherical projections of which are given in Fig. 2 and 3, respectively. The corresponding rendering format for a fragmented biopsy specimen is shown in Fig. 7. As you can see, the spherical and cylindrical projections provide valuable information about the structure of the sample.



**Рис. 5.** Визуализация структуры рассеяния для мелкодисперсной калибровочной смеси (преобладают субмикронные частицы). Цилиндрическая геометрия проекции  
**Fig. 5.** Rendering of the scattering structure for a finely dispersed calibration mixture (submicron particles predominate). Cylindrical geometry of the projection.

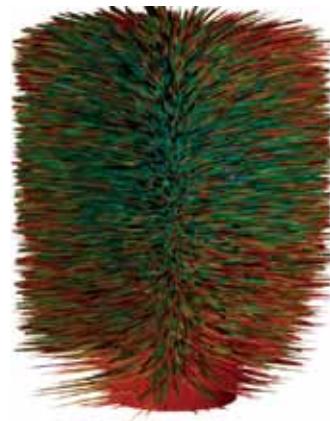
низовать такие измерения и на более простом аппаратном уровне, однако это является тематикой регистрации интеллектуальной собственности и определенно станет предметом следующих статей.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 16-32-00914.

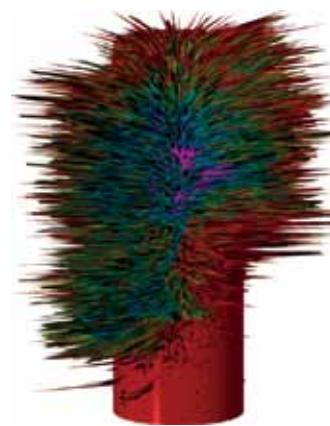
### ЛИТЕРАТУРА

1. Сидько Ф.Я., Лопатин В.Н., Парамонов Л.Е. Поляризационные характеристики взвесей биологических частиц. – Новосибирск: Наука, 1990.  
*Sid'ko F.YA., Lopatin V.N., Paramonov L. E. Polaryazatsionnye kharakteristiki vzvesej biologicheskikh chastits. – Novosibirsk: Nauka, 1990.*
2. Fiorani L., Palucci A., Spizzichino V., Maltsev V.P., Nekrasov V.M., Semyanov K.A. Scanning flow cytometer modified to distinguish phytoplankton cells from their effective size, effective refractive index, depolarization, and fluorescence // Applied Optics, 2008, v.47, № 24, p.4405-4412.
3. Maltsev V.P., Chernyshev A.V., Semyanov K.A., Soini E. Absolute realtime determination of size and refractive index of individual microspheres // Measurement Science and Technology, 1997, v.8, p.1023–1027.
4. Shvalov A.N., Surovtsev I.V., Chernyshev A.V., Soini J.T., Maltsev V.P. Particle classification from light scattering with the scanning flow cytometer // Cytometry, 1999, v.37, p.215–220.
5. Berdnik V.V., Gilev K., Shvalov A., Maltsev V., Loiko V.A. Characterization of spherical particles using high-order neural networks and scanning flow cytometry // Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer, 2006, v.102, № 1, p.62–72.
6. Класс Е. В. Индикатриса обратного отражения сферы с двумасштабным рельефом шероховатой поверхности // Оптика и спектроскопия, 2017, Т. 123, №. 6, с. 977–984.  
*Klass E. V. Indikatrisa obratnogo otrazheniya sfery s dvumasshtabnym rel'efom sherokhovatoj poverkhnosti // Optika i spektroskopiya, 2017, T. 123, №. 6, p.977–984.*
7. Ustinov A.V. Procedure for computing the scattering indicatrix in the optical range on the basis of a reflection coefficient etalon // Measurement techniques, 1996, v.39, № 12, p.1210–1211.
8. Kittler R. Relative scattering indicatrix: derivation from regular radiance/luminance distribution sky scans // International Journal of Lighting Research and Technology, 1993, v.25, № 3, p.125–127.
9. Kochelaev E. A., Volchek A. O., Sidorenko V. M. Метод расчета индикатрисы флуоресценции частиц аэрозоля // Известия СПбГЭТУ ЛЭТИ, 2011, № 9, с. 110–118.  
*Kochelaev E. A., Volchek A. O., Sidorenko V. M. Metod rascheta indikatrisy fluorescentsii chastits aehrozolya // Izvestiya SPbGEHTU LEHTI, 2011, № 9, p.110–118.*
10. Gather M.C., Yun S. H. Single-cell biological lasers // Nature Photonics, 2011, v.5, № 7, p.406.
11. Humar M., Yun S. H. Intracellular microlasers // Nature photonics, 2015, v.9, № 9, p.572–576.
12. Holmes T.J., Liu Y. H. Acceleration of maximum-likelihood image restoration



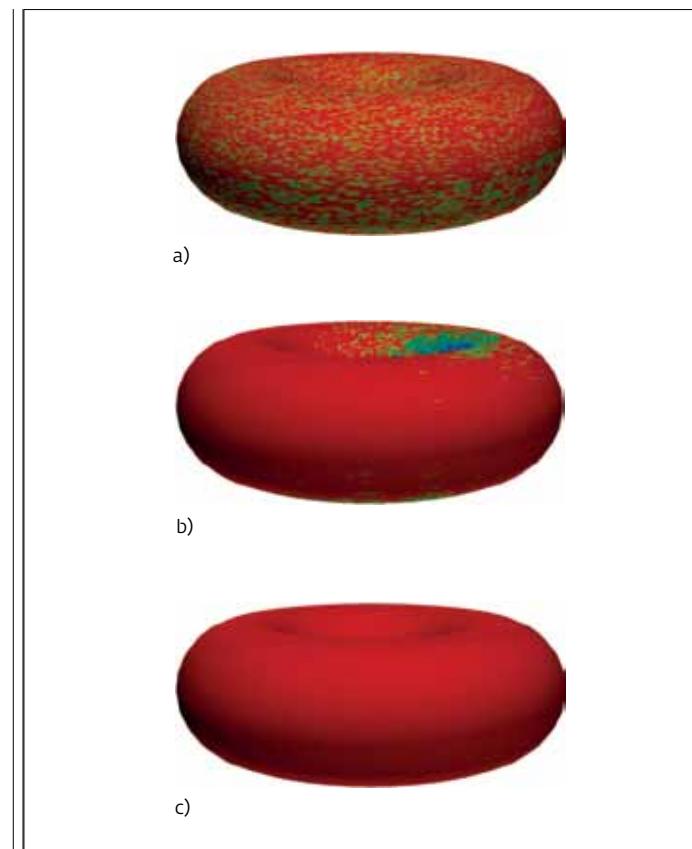
**Рис. 6.** Визуализация структуры рассеяния для грубо-распределенной калибровочной смеси (в наличии также микронные и декамикронные в шлейфах распределений частицы). Цилиндрическая геометрия проекции  
**Fig. 6.** Rendering of the scattering structure for the coarsely dispersed calibration mixture (in the presence of micron and decamicron particles in the trails of distributions). Cylindrical geometry of the projection.

The measurement targets are easily rendered and can be machine-recognized (using software tools for machine learning of stereometric identification of structures) after filtering diffuse/dispersion



**Рис. 7.** Локализованный четко дифференцированный (сиренево окрашенная часть проекции) от фона (красный) и диффузного шума (желтый) паттерн клеточной структуры (фрагментированного образца биопсии). Цилиндрическая геометрия проекции  
**Fig. 7.** Localized clearly differentiated (violet part of the projection) from the background (red) and diffuse noise (yellow) pattern of the cell structure (fragmented biopsy specimen). Cylindrical geometry of the projection

- for fluorescence microscopy and other noncoherent imagery // JOSA A, 1991, v.8, № 6, p.893–907.
13. **Shevchenko V.V.** A new three-dimensional scattering indicatrix and the photometric properties of the moon // Soviet Astronomy, 1979, v.23, p.741.
  14. **Finashkin S.V.** Effect of the Scattering Indicatrix on the Accuracy of Measurement of Distances by the Optical Triangulation Method // Measurement Techniques, 2001, v.44, № 2, p.141–145.
  15. **Gavrilovich A. B.** Analytical solution of the radiation transfer equation for a three-dimensional volume of a disperse medium with an arbitrary scattering indicatrix // Journal of Engineering Physics and Thermophysics, 2009, v.82, № 3, p.522–532.
  16. **Makishima K.** 3-Dimensional analysis of light scattering phenomena in indicatrix // The Papers of Technical Meeting, IEE Japan, 1998, v.98, p.43–48.
  17. **Романова Л. М.** Решение уравнения переноса излучения в случае индикатрисы рассеяния, сильно отличающейся от сферической // Оптика и спектроскопия, 1962, т. 13, № 3, p.429–435.
  18. **Romanova L. M.** Reshenie uravneniya perenosa izlucheniya v sluchae indikatrisy rasseyaniya, sil'no otlichayushcheyasja ot sfericheskoy // Optika i spektroskopiya, 1962, t.13, № 3, p.429–435.
  19. **Zubko E. S., Shkuratov Y. G.** Calculation of the scattering indicatrix of systems of spheres based on the dimensionless formulation of the solution of the Mie problem // Optics and Spectroscopy, 2001, v.90, № 6, p.849–852.
  20. **Shepelevich N.V., Lopatin V.V., Maltsev V.P., Lopatin V.N.** Extrema in the light-scattering indicatrix of a homogeneous sphere // Journal of Optics A: Pure and Applied Optics, 1999, № 4, p.448.
  21. **Kokhanovskii A. A., Babenko V. A.** To asymmetry of large spherical particles light-scattering indicatrix // Journal of Optics and Spectroscopy, 1996, v.81, p.292–298.
  22. **Лопатин В. Н., Шаповалов К. А.** Интегральная индикатриса светорассеяния "мягких" сферических частиц в малоугловой области // Оптика и спектроскопия, 1995, т. 78, № . 5, с. 817.
  23. **Lopatin V. N., SHapovalov K. A.** Integral'naya indikatrisa svetorasseyaniya "myagkikh" sfericheskikh chastits v malouglowej oblasti // Optika i spektroskopiya, 1995, t. 78, № . 5, p.817.
  24. **Galimov E.R., Pryakhin Y.A., Tukbaev E. E., Galimova N. Y., Fazlyev L. R.** Formation of scattering indicatrix of retroreflective coatings with microspheres // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 2017, v.240, № 1, p.012017.
  25. **Класс Е. В.** Индикатриса обратного отражения сферы с двумасштабным рельефом шероховатой поверхности // Оптика и спектроскопия, 2017, т. 123, № . 6, с.977–984.
  26. **Klass E.V.** Indikatrisa obratnogo otrazheniya sfery s dvumashtabnym rel'efom sherokhovatoj poverkhnosti // Optika i spektroskopiya, 2017, t.123, № . 6, p. 977–984.
  27. **Шатилов А.В.** О рассеянии света диэлектрическими эллипсоидами, сравнимыми с длиной волны. 1. Общее выражение для индикатрисы рассеяния эллипсоидальной частицы // Оптика и спектроскопия, 1960, т. 9, № 1, с. 86–91.
  28. **SHatilov A.V.** O rasseyanii sveta dielektricheskimi ehllipsoidami, sravnimymi s dlinoj volny. 1. Obshhee vyrazhenie dlya indikatrisy rasseyaniya ehllipsoidal'noj chasty // Optika i spektroskopiya, 1960, t.9, № 1, p.86–91.
  29. **Стерлядин В. В.** Индикатрисы рассеяния эллипсоидальных капель воды // Оптика и спектроскопия, 1990, т. 69, № 6, с. 1357.



**Рис. 8.** Тороидальные проекции результатов измерений с лазерных безлинзовых сканирующих микроскопов семейства "Кватернион": а – гетеродисперсная среда с равномерной седиментацией в тороидальной проекции; б – локализованный на чипе-проекторе образец биопсии; в – источник ложноотрицательного результата в условиях калибровки по невидимому препарату во внутренней проекции тора

**Fig. 8.** Toroidal projections of measurement results from "Quaternion"-type laser lens-free scanning devices: a – heterodispersed medium with uniform sedimentation in the toroidal projection; b – biopsy specimen localized on the chip-projector; c – source of false negative result under calibration the conditions according to the invisible preparation in the inner projection of the torus

noise on spherical and cylindrical projections. The problem of identification on the torus is significantly less optimistic, from the standpoint of identification, due to the intersection of the rays and the cross-noise of the channels. Often, three-dimensional ray renderings, similar to that shown in Fig. 2–7, are heuristically meaningless and do not say anything about the nature of the sample, for topological reasons, when a part of the projection from the sample is inside the torus. This also leads to errors in the calibration process, when calibration is carried out on a false-negative background, and



- Sterlyadkin V.V. Indikatrisy rasseyaniya ehllipsoidal'nykh kapel' vody // Optika i spektroskopiya, 1990, t.69, № 6, p.1357.
26. Шаповалов К.А. Рассеяние света цилиндром конечной длины в приближении Вентцеля-Крамерса-Бриллюэна. 3. Индикатриса светорассеяния // Оптика атмосферы и океана, 2008, т. 21, № 3, с. 223–225.
- SHapovalov K.A. Rasseyanie sveta tsilindrom konechnoj dliny v priblizhenii Venttselya-Kramersa-Brillyuehna. 3. Indikatrisa svetorasseyanija // Optika atmosfery i okeana, 2008, t.21, № 3, p.223–225.
27. Шаповалов К.А. Рассеяние света частицами цилиндрической формы в приближении Рэлея-Ганса-Дебая. 1. Стого ориентированные частицы // Оптика атмосферы и океана, 2004, т. 17, № 4, с. 350–353.
- SHapovalov K.A. Rasseyanie sveta chasitcami tsilindrcheskoj formy v priblizhenii Rehleya-Gansa-Debaya. 1. Strogo orientirovannye chasitsy // Optika atmosfery i okeana, 2004, t.17, № 4, p.350–353.
28. Шаповалов К.А. Рассеяние света частицами цилиндрической формы в приближении Рэлея-Ганса-Дебая. 2. Хаотично ориентированные частицы // Оптика атмосферы и океана, 2004, т. 17, № 8, с. 627–629.
- SHapovalov K.A. Rasseyanie sveta chasitcami tsilindrcheskoj formy v priblizhenii Rehleya-Gansa-Debaya. 2. Khaotichno orientirovannye chasitsy // Optika atmosfery i okeana, 2004, t.17, № 8, p.627–629.
29. Shapovalov K.A. Light scattering by particles of toroidal shape in the Rayleigh-Gans-Debye approximation // Optics and Spectroscopy, 2011, T. 110, № 5, cc. 806–810.
30. Maltsev V.P. Estimation of morphological characteristics of single particles from light scattering data in flow cytometry // Russian Chemical Bulletin, v.43, p.1115–1124.
31. Notchenko A.V., Gradov O.V. A five-axis arm-manipulator laser system & an algorithm for digital processing of output data for recording and morpho-topological identification of cells and tissue structures // Visualization, Image Processing and Computation in Biomedicine, 2013, v.2, № 1, DOI: 10.1615/VisualizImageProcComputatBiomed.2013005967
32. Gradov O.V., Notchenko A.V., Oganessian V.A. The neurogoniometry: Applied optical analysis for neural structure directogramm/radiation pattern measurements // Optics, 2015, v.4, № 6, c. 37–42.
33. Belyaev A.A., Palagashvili E.I. Determination of the particle size distribution function from the scattering indicatrix in the presence of speckle // Optics and Spectroscopy, 1982, v.53, p.571–572.
34. Ushakov V.V. An annular method of recording the scattering indicatrix in a diffraction strucutrometer // Journal of Applied Spectroscopy, 1978, v.28, № 3, p.382–384.
35. Matyushkin L.B., Aleksandrova O.A., Moshnikov V.A. A device for measuring the scattering indicatrix of the nanomaterial synthesis process // Glass Physics and Chemistry, 2017, v.43, № 3, p.263–266.
36. Morozova S.P., Morozov P.A., Lisyanskii B.E., Sholokhov V.A., Malysheva T.P., Perfilova T.G. Scanning analyzer for studying the three-dimensional radiation pattern of a CO<sub>2</sub> laser // Measurement Techniques, 1978, v.21, № 5, p.627–629.
37. Alekseev V.N., Kotylev V.N., Liber V.I. Two-coordinate control of the radiation pattern of a chemical non-chain electric-discharge DF laser by using space – time light modulators // Quantum Electronics, 2008, v.38, № 7, p.670–672.
38. Logginov A.S., Plisov K.I.I. Injection laser with a stably scanning radiation pattern // Quantum Electronics, 2005, v.35, № 2, p.111–115.

the presence of non-rendered structures is not taken into account. This effect can be shown with sufficient accuracy on models. Fig. 8-a shows a pattern for a heterodisperse medium with uniform sedimentation in a toroidal projection. Fig. 8-b shows a pattern of a localized sample projected on a torus (the same notation for pseudocolors as in Figure 4, Figure 7), and Fig. 8-c, which could be taken as the absolute zero of calibration in this projection, shows the same sample of a fragmented biopsy, but smaller and biased (in the space of the recording chamber).

Since 3D-rendering takes significant computer time, it is not optimal for scaling and rotating internal projections on the torus when calibrated in a fast experiment on live cells, colloids deposited, etc. Therefore, in order to avoid operator errors, we cannot recognize toroidal projections as heuristically valuable as spherical or cylindrical projections. For this reason, the final software (for biocolloid chemistry and laser biophysics) does not have rendering on the torus integrated.

## DISCUSSION

Thus, a multi-angle system for scanning mapping of biological samples in different geometries is created, qualitatively different both from the diffraction structure meters of the past [34] registering the structures using scattering indicatrices, and from the modern devices for measuring particles in the nanoscale [35], primarily by the geometry of the projection and the dimension of the rendering. It should be noted that the stereometric "Quaternion"-type setups are not identical to the standard laser radiation pattern 3D-scanners [36, 37], since they analyze the parameters of the samples (cells, colloid particles) rather than the actual beam used only in calibration with subsequent subtraction of the profile or in speckle-mediated methods of analyzing biological structures on a chip, which, however, does not exclude the need for this type of setup in lasers with a stably scanning directivity pattern [38] or using specialized acoustic and optical deflectors for scanning. The available know-how makes it possible to organize such measurements on a simpler hardware level, however this is the subject of registration of intellectual property and, in part, the subject of the following articles.

## ACKNOWLEDGMENTS

The work was supported by the RFBR grant 16-32-00914.