



БЕЗЛИНЗОВАЯ ГЕМОЦИТОМЕТРИЯ НА ЧИПЕ СО ВТОРИЧНЫМ ПРЕОБРАЗОВАНИЕМ СИГНАЛОВ / ИЗОБРАЖЕНИЙ КЛЕТОК В РАМКАХ НЕКАНОНИЧЕСКОЙ ФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ

О. В. Градов¹, gradov@chph.ras.ru;

gradov@center.chph.ras.ru,

Ф. А. Насиров¹, А. Г. Яблоков²

¹Институт энергетических проблем химической физики РАН им. В. Л. Тальрозе, Лаборатория биологического воздействия наноструктур, Москва

²Инфекционная клиническая больница № 2 Департамента здравоохранения, Москва

История применения безлинзовой микроскопии в гематологии является классическим примером биомедицинской инженерии, не приемлемой в достаточной мере профессиональными медиками. Из-за этого диагностическая ценность метода не была замечена таким образом, как это могло бы произойти в случае правильной расстановки приоритетов. В настоящей работе рассматривается новый метод гемоцитометрии и количественного анализа форменных элементов крови на чипе. Метод основан на шлирен-проекциях образца крови на плоскость детектора и визуализации (фотометрическом картировании) на уровне одиночных клеток с применением фотометрической модели Ломмеля-Зелигера. Это позволяет визуализировать клетки в объеме без использования объемного сканирования или оптической томографии. Приводятся результаты калибровочного использования данной техники на примере клеток крови нормального (условно здорового) донора.

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Зарубежные работы в области безлинзовой цитометрии на чипе

Первые зарубежные работы в области безлинзовой микроскопии крови и безлинзовой цитометрии восходят к 2008 году, когда были аннотированы,

LENSLESS ON-CHIP-HEMOCYTOMETRY WITH SECONDARY PROCESSING OF CELL SIGNALS / IMAGES IN THE FRAMEWORK OF AN UNCONVENTIONAL PHOTOMETRIC MODEL

O. V. Gradov¹, gradov@chph.ras.ru;

gradov@center.chph.ras.ru,

P. A. Nasirov¹, A. G. Jablovkov²

¹Talroze Institute for Energy Problems of Chemical Physics RAS, Laboratory of Biological Effects of Nanostructures, Moscow, Russia

²Moscow Infectious Clinical Hospital No. 2, Moscow, Russia

In this work, a new method of hemocytometry and quantitative analysis of blood cells on a chip is considered. The method is based on schlieren projections of a blood sample on the plane of the detector and visualization (photometric mapping) at the level of single cells using Lommel-Seeliger photometric model. This allows visualization of cells in the volume without using volume scanning or optical tomography. The results of the calibration use of this technique are given on the blood sample of the conventionally healthy donor.

1. INTRODUCTION

1.1. Foreign work in the field of lensless on-chip cytometry

The first foreign work in the field of lensless microscopy of blood and lensless cytometry dates back to 2008, when the basic and widely available technologies of lensless on-chip cytometry were annotated and later tested on reference samples. They were first tested using normal erythrocytes, yeast cells and calibration microspheres for metrological calibration [1], and then applied for a simple morphometric analysis of blood, which isolated red blood cells, white blood cells and platelets [2]. These methods were based on the use of standard types of CMOS image sensors. Such standard photosensitive elements traditionally used in most digital cameras, video and Web cameras, have

а впоследствии апробированы на референсных образцах элементарные и общедоступные техники безлинзовой цитометрии на чипе. Они были применены к нормальным эритроцитам, клеткам дрожжей и калибровочным микросферам для метрологической калибровки [1], а затем – апробированы для простого морфометрического анализа крови, выделявшего эритроциты, лейкоциты и тромбоциты [2]. Данные методы базировались на использовании стандартных типов КМОП-матриц. Такие стандартные светочувствительные элементы традиционно используются в большинстве цифровых фото-, видео- и веб- камер, обладающих красным – R, зеленым – G и синим – B каналами регистрации цветного изображения. В стандартной цифровой фотографии регистрируемый сигнал является интегральной характеристикой, собранной с нескольких пикселей. В случае контактной работы с клетками крови одному пикселу (в одной точке изображения) сопоставлен только один цвет, поэтому существенным технологическим достижением стал переход от обычного широкопольного безлинзового мониторинга в техниках LUCAS (Lensless Ultrawidefield Cell [monitoring] Array for Shadow [imaging]) к спектральному/цветовому мониторингу (Multi-Color LUCAS) [1].

Однако первичные вариации схемы данного метода были лишены нескольких свойств, которые являются фундаментальными для диагностики в реальном анализе крови. Во-первых, отсутствовала возможность работы с неокрашенными клетками. Поэтому при первоначальном использовании метода лейкоциты приходилось предварительно окрашивать. Во-вторых, отсутствовала трехмерная (3D) визуализация формы клеток крови в образце. Более того, реконструкция в технологиях голографической безлинзовой цитометрии на чипе требовала, в первую очередь, специальной цифровой обработки ("деконволюции") для перехода от амплитудного голографического образа клетки к планарному – не объемному – ее реконструированному изображению [3]. Аналогичная по сложности предварительная обработка требуется для фазовой голографии при безлинзовой микроскопии [4], которая также не дает псевдотрехмерных или трехмерных изображений клеток, но только их дифракционные картины/интерференционные паттерны. После процедуры восстановления по фазе, с точки зрения метрологического обеспечения, результаты измерений на безлинзовых чипах – микроцитометрах становятся близкими к результатам счета кле-

red – R, green – G and blue – B channels of color image registration. In a standard digital photograph, the recorded signal is an integral characteristic collected from several pixels. In the case of contact work with blood cells per pixel (at one point of the image) only one color is matched, therefore a significant technological achievement was the transition from the usual wide-field lensless monitoring using LUCAS (Lensless Ultrawidefield Cell [monitoring] Array for Shadow [imaging]) to multispectral/color monitoring (Multi – Color LUCAS) [1].

However, the primary variations of this method's scheme had been deprived of a number of properties which are fundamental for diagnostics in a real blood analysis. Firstly, there was no opportunity to work with unstained cells. Therefore, during the initial use of the method, leukocytes had to be pre-stained. Secondly, three-dimensional (3D) visualization of blood cells form in the sample was absent. Moreover, reconstruction of a holographic lensless on-chip cytometry technology required, first of all, a special digital processing ("deconvolution") to transit from the amplitude holographic image of the cell to its planar (not volumetric) reconstructed image [3]. Similar pre-processing is required for the phase holography in lensless microscopy [4], which also does not give pseudo-three-dimensional or three-dimensional image of the cells, but only their diffraction/interference patterns. After recovery procedure in phase, from the metrological viewpoint, the results of measurements on lensless chips – microcytometers, become close to the results of cell counting using conventional clinical laboratory impedance Coulter counters [4]. This fact makes it possible to talk about the prospects for the automatic interpretation of leukocyte blood count by methods of lensless holographic cytometry on selective chips [5].

Since it is difficult to develop a metrological certification method for a fluorescence cytometric method that is implemented on a chip (CMOS image sensor), the efficiency of analysis, counting and classification of cells using this method is low. The reason lies in the fact that almost all cell types are displayed by the time integrated signal in the form of a Gaussian peak of diffuse luminescence, and the task of separating emission and excitation beam on a chip is difficult and almost unbridgeable for the users without special background in physics. Therefore, the problem of metrological certification of the fluorescent cytometric method has not yet been solved [6]. From the point of view of ensuring traceability to the standard (metrological assurance



ток с помощью обычного лабораторно-клинического импедансного счетчика Коултера [4]. Этот факт дает возможность говорить о перспективах автоматической интерпретации лейкоцитарной формулы крови технологиями безлинзовой голографической цитометрии на селективных чипах [5].

Так как трудно разработать методику метрологической аттестации флуоресцентного цитометрического метода, имплементируемого на чипе на КМОП-матрице, то эффективность анализа, подсчета и классификации клеток при использовании данного метода низкая. Причина кроется в том, что практически все типы клеток отображаются в нем интегральным по времени сигналом в виде гауссового пика диффузного свечения, а задача разделения эмиссии и пучка возбуждения на чипе является сложной и практически непреодолимой для пользователей (с нефизическим образованием, по крайней мере). Поэтому проблема метрологической аттестации флуоресцентного цитометрического метода пока не решена [6]. С точки зрения обеспечения прослеживаемости к эталону (метрологическое обеспечение единства измерений) меньшую методическую погрешность дает метод дифференциального интерференционного контраста (DIC) на чипе. Для применения этого метода требуется провести тонкую подстройку одноосного кристалла и поглощающего анализатора [7]. Причем метод выдает псевдоцветные изображения (в силу свойств DIC-метода, эквивалентно использованию оптики Номарского или Плуто). В голографическом случае с использованием некогерентных источников цифровая обработка голограмм, полученных с использованием DIC, восстанавливает дифференциальное фазово-контрастное изображение образца в широком поле зрения (24 мм²).

Еще один путь, ведущий к улучшению метрологических характеристик аналитики в безлинзовой голографической цитометрии крови, это – алгоритмическое (то есть имплементируемое с использованием компьютерных программ для обработки изображений) увеличение разрешения – метод сверхразрешения субпиксельного уровня дискретизации [8]. До недавнего времени резольвометрические свойства и сложность обработки информации голографических цитометров на чипе препятствовали их внедрению в лабораторно-диагностическую и клиническую практику.

С точки зрения диагностики, прецеденты гематологического внедрения безлинзовой гол-

of the uniformity of measurements), the method of differential interference contrast (DIC) on a chip gives a smaller methodological error. To apply this method, it is required to fine-tune the uniaxial crystal and the absorbing analyzer [7], and the method produces pseudo-color images (due to the properties of DIC, equivalent to the use of Nomarsky or Pluto optics). In the holographic case using non-coherent sources, digital processing of holograms obtained using DIC reconstructs the differential phase-contrast image of the sample in a wide field of view (24 mm²).

Another way to improve metrological characteristics of analytics in lensless holographic blood cytometry is the algorithmic (i. e., implemented using computer programs for image processing) increase in resolution – the method of sub-pixel super-resolution [5]. Until recently, resolvometric properties and the complexity of processing information on holographic on-chip cytometers prevented their introduction into laboratory diagnostic and clinical practice.

From the point of view of diagnostics, the precedents of hematological introduction of lensless holographic on-chip cytometry are of a piece nature, mainly limited to the field of medical parasitology at the level of individual non-clinical self-diagnosis in third world countries and developing countries. Thus, compact devices of super-resolving holographic on-chip lensless microscopy were tested for the automated diagnosis of malaria [9]. The accuracy of the diagnosis of this disease (i. e., the identification of *Plasmodium falciparum*, and *P. vivax* using a certain database) is automatically indicated by the use of crowdsourcing platforms and identification of blood cells without verifying the results of the analysis, since the systematization of the material in the case of building a database for the detection of malaria plasmodia was carried out by non-specialists in the order of the "network game" [10]. Obviously, and it goes without saying that with any metrological accuracy of a holographic lensless cytometer as an optical device, this method, when using incorrectly validated morphometry databases, cannot be accepted by physicians for incorporation into diagnostic technology.

Probably, this circumstance gave rise to the rejection of the method among the specialists involved in the development of holographic cytometers. Therefore, already in 2013, they switched from the idea of lensless cytometry to the ideas of democratization of hematological analysis in general, including on camera phones, which had already appeared by that time [11]. The main advantage of the



графической цитометрии на чипе имеют штучный характер, преимущественно ограничиваясь областью медицинской паразитологии на уровне индивидуальной неклинической самодиагностики в странах третьего мира и развивающихся странах. Так, апробированы компактные устройства сверхразрешающей голографической безлинзовой микроскопии на чипе для автоматизированной диагностики малярии [9]. О точности диагностики этого заболевания (то есть идентификации *Plasmodium falciparum*, *P. falciparum* и *P. vivax* по некоторой базе данных) автоматически говорит факт привлечения краудсорсинговых платформ и идентификации клеток крови без верификации результатов анализа. Потому что систематизация материала в случае построения базы данных для определения малярийных плазмодиев осуществлялась неспециалистами в порядке "сетевой игры" [10]. Очевидно и само собой разумеется, что при любой метрологической точности голографического безлинзового цитометра как оптического устройства, этот метод при использовании некорректно валидированных баз данных морфометрии не может быть принят медиками для внедрения в технику диагностики.

Вероятно, это обстоятельство породило неприятие метода в среде специалистов, занимавшихся разработкой голографических цитометров. Поэтому уже в 2013 году они перешли от идеи безлинзовой цитометрии к идеям демократизации гематологического анализа вообще, в том числе – на камерофонах, уже появившихся к тому времени [11]. Основным преимуществом метода безлинзовой цитометрии оставалась компактность систем из-за отсутствия оптического тракта на линии сканирования и отсутствия линз. Это, в свою очередь, определяло экономическую эффективность метода. При этом эффективность или робастность (надежность) подобных систем диагностики достигается уже не за счет физической простоты безлинзового контактного цитометра, а в силу использования мощных алгоритмов глубинного обучения нейронных сетей, отвечающих за принятие диагностических решений [12]. Но в процессе восстановления фаз и реконструкции голографического изображения также используются нейронные сети [13], техники машинного обучения которых занимают много времени. Это может, в свою очередь, стать очередным препятствием на пути использования технологий безлинзовой цитометрии на чипе в гематологии.

Линсless cytometry method was the compactness of the systems due to the lack of an optical path on the scanning line and the absence of lenses. This, in turn, determined the economic efficiency of the method. At the same time, the efficiency or robustness (reliability) of such diagnostic systems is no longer achieved due to the physical simplicity of the lensless contact cytometer, but due to the use of powerful algorithms for in-depth training of neural networks responsible for making diagnostic decisions [12]. But in the process of phase reconstruction and reconstruction of the holographic image, neural networks [13] are also used, whose machine learning techniques take a lot of time. This, in turn, may become another obstacle to the use of lensless on-chip cytometry technology in hematology.

The history of lensless microscopy in hematology is a classic example of biomedical engineering, which was not adequately accepted by medical professionals. Because of this, the method yielded a much lower heuristic/diagnostic value than would be the case if the priorities were set correctly. If we consider the product of medical use as the final result of biomedical engineering, it is quite obvious that the emphasis of measurements should be placed in the field of diagnostic qualimetry rather than metrology; in the field of not so much engineering as hematology. Groups of researchers who worked on this topic with a greater emphasis in the biomedical area, by definition, are more focused on medical practice and clinical approbation of the system than on permanent improvement of metrological parameters when creating a recording device.

1.2. Domestic development of lensless on-chip hemocytometers

In Russia, work on lensless on-chip cytometry has been going on since 2009, if we consider the development of devices that are applicable in hematology. But experiments on phase correlometric analysis of the signal of biomedical objects from charge-coupled devices and CMOS image sensors have been conducted since 2007 by groups of authors of this article. The groups obtained the results of experiments using both laser and non-coherent radiation sources. A number of works carried out earlier in the framework of the Russian collaboration (institutes of the Russian Academy of Medical Sciences, departments of higher educational institutions in physiological and anatomical specialties), have led to a number of key results that have not yet been achieved by foreign teams. The basic list of results includes the following works:



История применения безлинзовой микроскопии в гематологии является классическим примером биомедицинской инженерии, не приемлемой в достаточной мере профессиональными медиками. Из-за этого метод принес много меньшую эвристическую/диагностическую ценность, чем это могло бы произойти в случае правильной расстановки приоритетов. Если рассматривать как итоговый результат биомедицинской инженерии продукт медицинского применения, то достаточно очевидно, что акценты измерений следует расставлять в области не столько метрологии, сколько квалиметрии диагностики; в области не столько инженерии, сколько гематологии. Группы исследователей, работавшие над данной тематикой с большим акцентом в биомедицинской области, по определению больше ориентированы на медицинскую практику и клиническую апробацию системы, чем на перманентное решение метрологических задач при создании регистрирующего устройства.

1.2. Отечественные разработки безлинзовых гемоцитометров на чипе

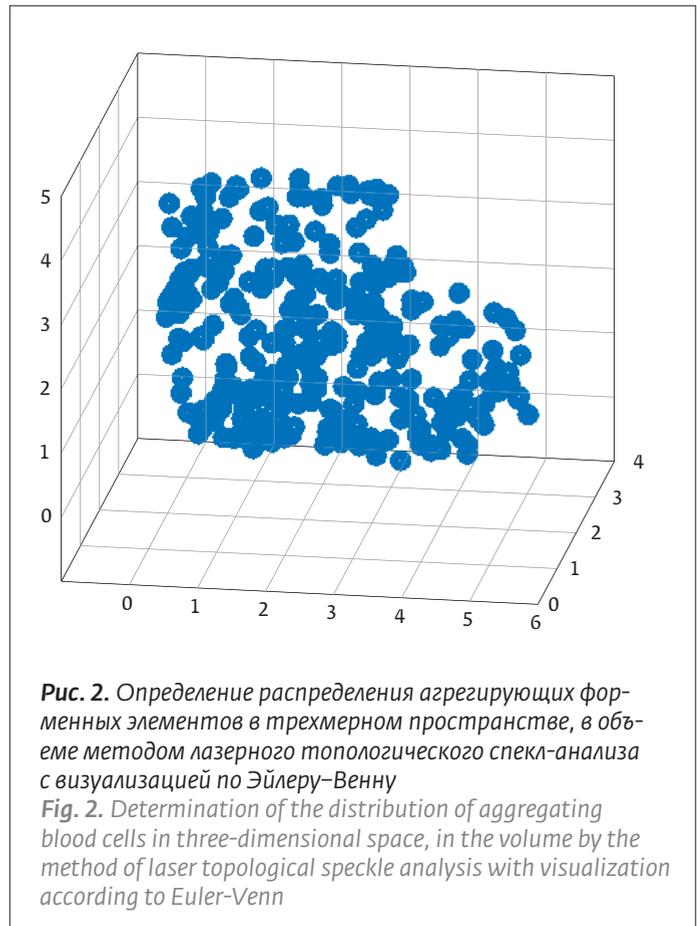
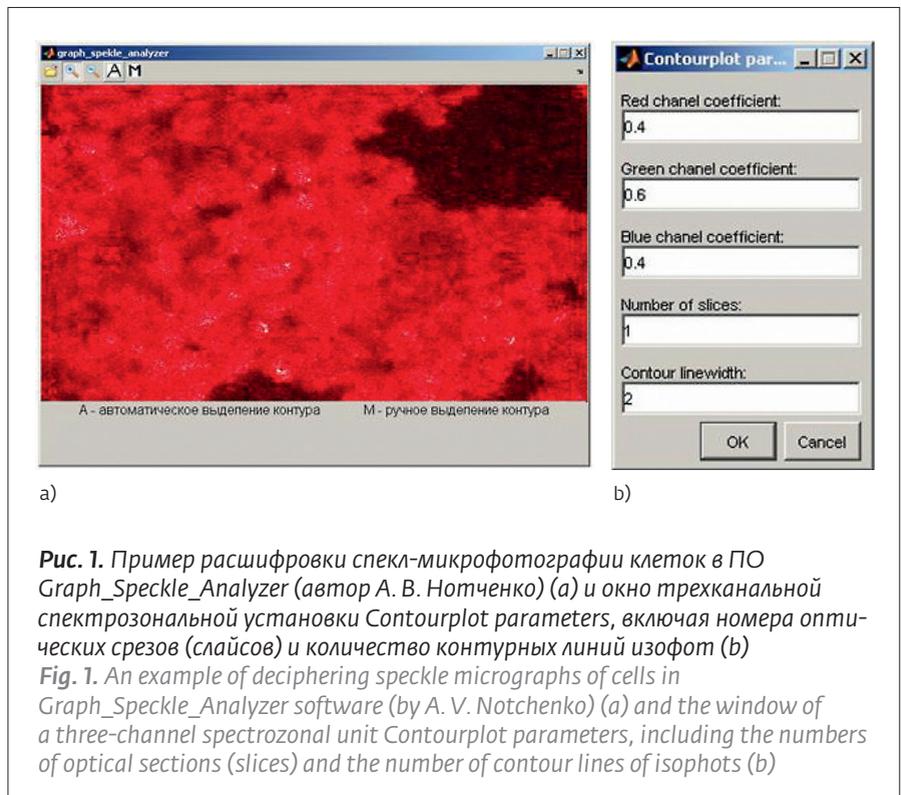
В России работы по безлинзовой цитометрии на чипе ведутся с 2009 года, если учитывать разработки конструкций, применимых в гематологии. Но эксперименты по фазокоррелометрическому анализу сигнала биомедицинских объектов с приборов с зарядовой связью и КМОП-матриц ведутся с 2007 года группами авторов данной статьи. Группа получила результаты экспериментов как с использованием лазерных, так и некогерентных источников излучения. Ряд работ, выполненных ранее в рамках российской коллаборации (институты РАМН, выпускающие кафедры вузов по физиологическим и анатомическим специальностям), привели к получению ряда ключевых результатов, не решаемых зарубежными командами. В базовый список результатов вошли работы, в ходе которых:

1. Показана применимость безлинзового спекл-интерферометрического, безлинзового спеклографического анализа не только для измерений и идентификации зрелых форменных элементов крови и получения как итогового результата расширенной лейкоцитарной формулы крови, но и для анализа пролиферативной активности и дифференцировки (для клеток костного мозга и на модельных культурах) [14]. Параллельно, в рамках инициативных НИР были найдены адекватные аппроксимации

1. The applicability of lensless speckle-interferometric, lensless speckle imaging analysis is shown not only for measuring and identifying mature blood cells and obtaining, as a final result, an extended blood leukocyte formula, but also for analyzing proliferative activity and differentiation (for bone marrow cells and on model cultures) [14]. In parallel, within the framework of initiative research, adequate approximations were found for the morphology of different types of cells (Poincaré and Henon, Chirikov and Gumovsky-Mira, Kepler, Volterra, Dufing and Henon-Heiles) [15]. The result of this work was the creation of on-chip cytometers (hemocytometers) in 2009–2011 with a microfluidic chip in the format of chambers for counting blood and cerebrospinal fluid cells, using the grids of which monitoring of the resolution of the reading chips ("on-chip resolvometry") is performed [16, 17].
2. For automated morphometry and cell classification in lensless cytometry, one of the authors of the articles [16–18] (Notchenko A. V.) created a program of deep learning. Its work has been tested both on stained blood samples and on nerve tissue sections. The compatibility of the multi-axis system of robotized sample positioning on Fedorov's automated table (which determines in part the metrological advantage of our development with respect to foreign analogues) and the cell scanning system in laboratories on a chip (in particular, blood cells) was ensured. In the articles [19, 20] a three-dimensional reconstruction of blood cells is performed (see Fig. 10 in these works and the corresponding Fig. 2 in this article), which is absent in the works of foreign peers. Such visualization can be used not only for cytometry purposes, but also for aggregometry and coagulometry. In other words, reconstruction by slices (i. e., optical slices) could be performed not only in two-dimensional, but also in three-dimensional form, as well as identification of cell types. Fig. 1, 2 explain this approach and the results of its application to blood cells (visualization of the aggregation of red blood cells).
3. On membrane-mimetic model structures with a specific for morphometric determination of hemolytic anemia and adjacent states morphology, the applicability of the algorithms and laser diagnostics of membranopathies (on models of microspherocytes, elliptocytes,

для морфологии разных типов модельных клеток (Пуанкаре и Хенона, Чирикова и Гумовского-Мира, Кеплера, Вольтерра, Дюфинга и Хенона-Хейлеса) [15]. Результатом этих работ 2009–2011 годов стало создание цитометров (гемоцитометров) на чипе с микрофлюидным чипом в формате камер для счета форменных элементов крови и спинномозговой жидкости, с использованием сеток которых проводится мониторинг разрешающей способности считывающих чипов ("резольвометрия на чипе") [16,17].

- Для автоматизированной морфометрии и классификации клеток при безлинзовой цитометрии один из авторов статей [16–18] (Нотченко А. В.) создал программу глубокого обучения. Ее работа апробирована как на окрашенных препаратах крови, так и на срезах нервной ткани. Была обеспечена совместимость многоосной системы роботизированного позиционирования образца на автоматизированном столике Федорова (определяющем отчасти метрологическое преимущество нашей разработки по отношению к зарубежным аналогам), и системы сканирования клеток в лабораториях на чипе (в частности, клеток крови). Так в статьях [19, 20] показана трехмерная реконструкция клеток крови (см. рис. 10 в данных работах и соответствующий им рис. 2 в настоящей статье), что отсутствует в работах зарубежных коллег. Такая визуализация позволяет использовать разработки не только в целях цитометрии, но и для агрегометрии и коагулометрии. Иными словами, реконструкция по слайсам (то есть оптическим срезам) могла производиться не только в двумерном, но и в трехмерном варианте, равно как и идентификация типов клеток. Рис. 1, 2 поясняют данный подход и результаты его применения к клеткам



- крови (визуализация агрегации эритроцитов).
3. На мембраномиметических модельных структурах специфической для морфометрического определения гемолитических анемий и смежных состояний формы продемонстрирована применимость алгоритмики лазерной диагностики мембранопатий (на моделях микросфероцитов, эллиптоцитов, стоматоцитов, эхиноцитов, акантоцитов) [21]. К нашему сожалению, в силу материально-технических ограничений для валидации, приведших к неверной интерпретации некоторых позиций и механизма формирования 3D-изображения, указанная статья может рассматриваться как частично ошибочная и не может до выхода наших следующих работ в этой области быть использована в целях идентификации типов клеток.
 4. Предложена схема картирования неоптических характеристик клеток/неоптических меток в безлинзовом цитометре на чипе. В ее основе – использование преобразователей сигнала гибридируемых агентов с неоптической формой сигнала в оптический сигнал с позиционной чувствительностью (под гибридируемыми агентами подразумеваются иммуномагнитные частицы, радиоизотопные метки, красители, используемые в качестве агентов фотодинамической диагностики, фотодинамической терапии, которые возбуждаются источниками излучения неоптического диапазона; etc.). То есть происходит привязка к конкретным клеткам и идентификация с конкретными классами клеток в базе данных, пополняемой техниками машинного обучения с учителем [22,23]. В частности, в недавнем прошлом была отработана программа для измерений на гемоцитобластах (в экспериментальных условиях) [24]. Аналогичная программа аннотирована для проведения работ в области лимфологии [25].

Целью данной работы является демонстрация эвристической ценности результатов, получаемых с отечественной конструкции безлинзовых цитометров на чипе. Разработка позволяет не применять на стадии сбора первичных данных голографические технологии, а использовать для сбора данных многоугловое сканирование с планарной матрицы. В статье демонстрируются

stomatocytes, echinocytes, acanthocytes) is demonstrated [21]. Unfortunately, due to financial and technical limitations for validation, which led to incorrect interpretation of some results obtained, this article can be considered as partially erroneous and cannot be used to identify cell types until our next works are published.

4. A scheme for mapping non-optical characteristics of cells/non-optical labels in a lensless on-chip cytometer is proposed. It is based on the use of signal converters of hybridized agents with a non-optical response to an optical signal with positional sensitivity (hybridisable agents are immunomagnetic particles, radioisotope labels, sensitizers used as agents of photodynamic diagnostics and photodynamic therapy, which are excited by radiation sources beyond the visible spectral range; etc.). That is, binding to specific cells takes place and is identified with specific classes of cells in a database updated by machine learning techniques with a teacher [22,23]. In particular, in the recent past, a program was developed for measurements on hemocytoblasts (under experimental conditions) [24]. A similar program is annotated for work in the field of lymphology [25].

The purpose of this work is to demonstrate the heuristic value of the results obtained from the domestic design of lensless on-chip cytometers. The development allows not to use either holographic technologies at the stage of collecting primary data, or to use multi-angle scanning from a planar image sensor for data collection. The article demonstrates the methods/algorithms for processing data from lensless on-chip cytometers. Their use will allow a hematologist not to waste time on a preliminary analysis of a hologram using a complex mathematical apparatus.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Design of a multi-angle on-chip hemocytometer

The hemocytometer is built on a lensless CMOS image sensor (for fixing sample images) with a radiation source positioned at programmed angles/in different coordinate systems. As a radiation source, we used either spectral LEDs (red for AlGaAs, GaP and AlGaInP; green for InGaN, AlGaP and GaN; blue for ZnSe, InGaN and SiC), or laser diodes, or DPSS (diode-pumping solid-state) lasers. The radiation of a laser or an incoherent source was projected with a given

методы/алгоритмы обработки данных с безлинзовых цитометров на чипе. Их применение позволяет гематологу не тратить время на предварительный анализ голограммы с использованием сложного математического аппарата.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Конструкция многоугольного гемоцитометра на чипе

Гемоцитометр построен на безлинзовой КМОП-матрице (для фиксации изображений образца) с позиционируемым под программируемыми углами/в различных системах координат источником излучения. В качестве источника излучения мы использовали либо спектрозональные светодиоды (красные – на AlGaAs, GaP и AlGaInP; зеленые – на InGaN, AlGaP и GaN; синие – на ZnSe, InGaN и SiC), либо лазерные диоды или DPSS-лазеры (твердотельные лазеры с диодной накачкой). Излучение лазера или некогерентного источника проецировали с заданной дискретностью шага на матрицу, на которой локализован образец (капля крови в поддерживаемых условиях).

В описываемой системе используется КМОП-сенсор смартфона iPhone 4S с размером пиксела 1,4 мкм. Для позиционирования источников излучения (LED/DPSS) под разными углами использован шаговый двигатель. Он управляется через аппаратно-программную среду "Arduino", принимающую команды G-CODE – языка программирования устройств с числовым программным управлением (Electronic Industries Alliance, стандарт RS274D; также – стандарт ISO 7-bit/ISO 6983-1:2009 или ГОСТ 20999-83). Программное обеспечение аппарата имеет возможность сохранения данных и передачи их на ЭВМ – приложение 645 PRO версии МКIII для регистрации качественной безлинзовой иллюстрации в формате со сжатием без потерь (в частности алгоритмами Лемпеля-Зива и Лемпеля-Зива-Велча для TIFF).

2.2. МАТЕРИАЛЫ И ОБРАЗЦЫ

Использовалась кровь условно-здорового анонимного донора, анализы которого, согласно данным независимой лаборатории, не показывали каких-либо патологий, способных влиять на результат измерений. Гепаринизацию и цитратный буфер применяли только для некоторых калибровочных проб с заведомо неинформативными с точки зрения диагностики результатами. На большей части проб было исследовано также и образование микроструктур (особо, при дегидратации пробы).

step increment on the image sensor on which the sample was localized (a drop of blood under supported conditions).

The described system uses the CMOS sensor of the iPhone 4S with a pixel size of 1.4 microns. A stepper motor was used to position the radiation sources (LED/DPSS) at different angles. It is controlled via the Arduino hardware and software platform, which accepts the commands of G-CODE, a programming language for devices with numerical control (Electronic Industries Alliance, RS274D standard; also, ISO 7-bit/ISO 6983-1:2009 or GOST 20999-83 standards). The software of the device allowing to save data and transfer it to a computer – МКIII version of 645 PRO application for registering high-quality lensless illustration in a lossless compression format (in particular, Lempel-Ziv and Lempel-Ziv-Welch algorithms for TIFF).

2.2. Materials and samples

A conditionally healthy anonymous donor's blood was used, the analyzes of which, according to data from an independent laboratory, did not show any pathologies that could affect the measurement result. Heparinization and citrate buffer were used only for some calibration samples with deliberately uninformative diagnostic results. In most of the samples, the formation of microstructures was also investigated (especially when the sample was dehydrated). Such samples were usually not subjected to any preliminary sample preparation. The sampling was carried out with a lancet-scarifier. Since the time from sampling before analysis did not exceed, as a rule, several minutes (considering the exposure of the sample already on the chip, sometimes it lasted longer, up to several tens of minutes), blood preservation or other preliminary manipulations were not required. Blood was injected onto a chip (lensless array) in a volume of not more than one drop (from 5 to 130 μl , depending on what the duration of the device operation in the recording mode changed).

2.3. Algorithms for data processing and software

After data was recorded by the МКIII version of 645 PRO application, the results were imported into a format compatible with the analyzing software (with partial changes in the quality and size of the file). To reconstruct the three-dimensional structure of blood cell samples, the usual formulas for photometric calculations were not used (the Bouguer-Lambert-Beer law). For these purposes, a photometric model of Lommel-Seeliger was adopted. This model



Такие пробы не были подвергнуты обычно никакой предварительной пробоподготовке. Забор пробы осуществлялся ланцетом-скарификатором. Так как время от забора пробы до анализа не превышало, как правило, нескольких минут (с учетом экспонирования образца уже на чипе – иногда длилось дольше, до нескольких десятков минут), то консервации крови или иные предварительные манипуляции не требовались. Кровь вводилась на чип (безлинзовую матрицу) в объеме не более одной капли (от 5 до 130 мкл, в зависимости от чего изменялась продолжительность работы устройства в режиме регистрации).

2.3. Алгоритмы обработки данных и программное обеспечение

После регистрации данных приложением 645 PRO версии МКIII результаты импортировались в формат, совместимый с анализирующим ПО (с частичным изменением качества и размеров файла). Для восстановления трехмерной структуры образцов клеток крови не использовали обычные формулы фотометрических расчета (закон Бугера-Ламберта-Бера). Для этих целей брали фотометрическую модель Ломмеля-Зеелигера (Lommel-Seeliger). Эта модель используется преимущественно в астрофотометрии, геодезических и астрогеологических измерениях. Она состоит из экспоненциального члена и полинома четвертого порядка в фазовой функции. При этом на карту оптической плотности/реконструкцию клеток при измерении шлирен-методом (теневом) в псевдотрехмерной репрезентации накладывались изофоты клеток – то есть изолинии их локальных оптических характеристик.

Результирующее изображение с изолиниями оптических характеристик, сопоставленными клеткам, исследовалось в режиме реального времени (без отрыва от процесса измерений, *in situ*; либо напрямую с экрана) с помощью QAVIS – программного обеспечения, разработанного в Дальневосточном отделении РАН. Это ПО позволяет анализировать изображения с получением коррелограмм, вейвлетограмм, корреляционно-спектральных характеристик с идентификацией отдельных клеток/их типов по результату идентификации корреляционно-спектральных характеристик – интегрально-частотных характеристик (ИЧХ) и интегрально-пространственных характеристик (ИПХ). При этом врач-пользователь не должен разбираться в математических аспектах диагностики, так как дружественный пользовательский интерфейс GUI выдает информацию

is used mainly in astrophotometry, geodesic and astrogeological measurements. It consists of an exponential term and a fourth-order polynomial in the phase function. At the same time, isophotes of cells were superimposed on the optical density map/cell reconstruction when using the schlieren-method (shadow method) in the pseudo-three-dimensional representation, i. e., the isolines of their local optical characteristics.

The resulting image with isolines of optical characteristics correlated to cells was studied in real time (without discontinuing the measurement process, *in situ*; or directly from the screen) using QAVIS, a software developed in the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences. QAVIS allows you to analyze images with obtaining correlograms, waveletgrams, correlation and spectral characteristics with the identification of individual cells/their types according to the result of identification of correlation and spectral characteristics – integral frequency characteristics (IFC) and integrated spatial characteristics (ISC). At the same time, the user doctor should not understand the mathematical aspects of diagnostics, since the friendly GUI user interface provides information (with the ability to save to a file) at an intuitively understandable output level.

3. RESULTS

3.1. Registration results

Figure 3 shows the results of registering a dehydrating blood drop with the size more than 1/16 of the chip surface. Registration was carried out using the shadow (schlieren-) method for constructing the relief, the photometric model of Lommel-Seeliger with the settings at 45° and 135°. Figure 4 shows a pseudo-three-dimensional representation of cells from the same sample with an arbitrary scale of heights and isophots overlays. Based on these images, one can see that without resorting to the holographic technique, as well as optical tomography, using lensless recording, LED and an algorithm built on the Lommel-Seeliger model, one can get high-quality graphic/photometric representations of blood cells. These images were obtained without using either phase reconstruction or wavefront analysis methods. The level of interference artifacts around the cells with this approach is much lower than when using standard UCLA methods (A. Ozkan group, see above), used for reconstruction of lensless holograms.

3.2. Detection of erythrocyte aggregation

During storage of preserved blood, or as a result of polyglobulia and various pathological and

(с возможностью сохранения в файл) на интуитивно-понятном уровне вывода.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Результаты регистрации

На рис. 3 показаны результаты регистрации дегидратирующейся капли крови (размер $>1/16$ поверхности чипа). Регистрация проводилась с использованием теневого (шлирен-) метода построения рельефа, фотометрической модели Ломмеля-Зелигера (Lommel-Seeliger) при установочных параметрах на чипе 45° и 135° . На рис. 4 приведена псевдотрехмерная репрезентация клеток из того же образца с условной шкалой высот и наложением изофот. Исходя из этих изображений, можно видеть, что, не прибегая к технике голографии, а также оптической томографии, пользуясь безлинзовой регистрацией, LED и алгоритмом, построенным на модели Ломмеля-Зелигера, можно получить высококачественные графические/фотометрические репрезентации клеток крови. Уровень интерференционных артефактов вокруг клеток при данном подходе намного ниже, чем при использовании стандартных методов UCLA (группа А.Озкана, см. выше), применяемых для реконструкции безлинзовых голограмм. При получении данных изображений не использовались методы восстановления фазы и анализа волновых фронтов.

3.2. Детектирование агрегации эритроцитов

При хранении консервированной крови, при полиглобулии и при разных патологических и компенсаторных процессах, с изменением СОЭ, агрегация эритроцитов идет с выраженным формированием стопок эритроцитов (типа "монетных столбиков" и т. п. форм). Данный процесс (в англоязычной литературе известный как "rouleaux") может наблюдаться на цитометрической безлинзовой установке. Он может быть детектирован по изменению характеристик крови с использованием чипа этой установки. Продемонстрируем это далее. Так, на ранних стадиях дегидратации капли крови (первые десять минут; в зависимости от объема/толщины слоя) можно видеть формирование этих структур *in situ* на чипе в режиме реального времени. Результат соответствующих явлений показан на рис. 5. При этом можно с кинетическим качеством (в динамике и с позиционной чувствительностью) определить агрегометрические свойства образца по вейвлеграмме соответствующих цитометрических

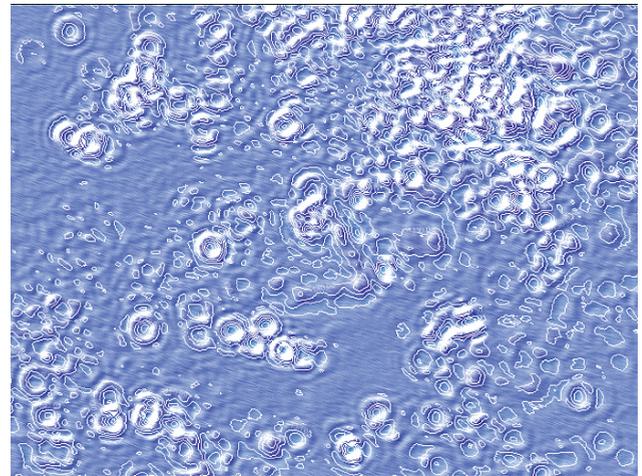


Рис. 3. Планарная проекция фрагмента дегидратирующейся капли крови ($>1/16$ поверхности чипа; шлирен-метод построения рельефа (Lommel-Seeliger): 45° к чипу, реконструируемое положение источника – 135°)
Fig. 3. Planar projection of a fragment of a dehydrating blood drop ($S>1/16$ of the chip surface; schlieren-method of the relief reconstruction (by Lommel-Seeliger) at 45° to the chip, the reconstructed source position is at 135°)

compensatory processes, with a change in ESR, the aggregation of erythrocytes occurs with a pronounced formation of stacks of erythrocytes (in the so-called "coin columns", or in other forms). This process (known as "rouleaux" in English language literature) can be observed on a cytometric lensless device, and can be detected by changing

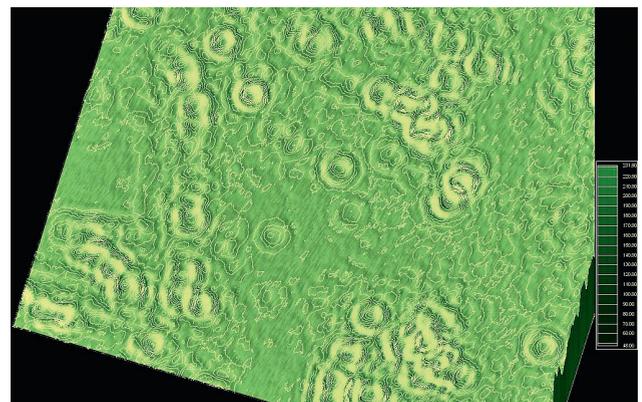


Рис. 4. Трехмерная барельефная реконструкция с условной шкалой высот и наложением изофот (тот же препарат, что и на рис. 3)
Fig. 4. Three-dimensional bas-relief reconstruction with a conditional scale of heights and overlay of isophots (the same sample as in Fig. 3)

паттернов/файлов регистрограмм с безлинзового чипа. Врач не обязан владеть самой техникой анализа данных, поскольку статистические результаты анализа по выборкам клеток крови, проходящих через анализатор, могут быть поняты с морфологических позиций, за тем исключением, что предметом анализа и интерпретации морфологической картины являются не микрофотографии, а вейвлетограммы. На рис. 6 приведен результат подобного автоматического различения уровней и стадий агрегации для разных морфологических типов картин, определенных клиницистом: а – норма, б – частичная агрегация (что можно охарактеризовать как "цепочка"), с – полная агрегация ("стопка").

3.3. Коррелографическое определение

Для более точного определения классов клеток без использования для этих целей стандартных морфометрических баз данных рационально иметь строгие количественные критерии отличий клеток крови по данным анализа их физических морфологических свойств. Нами было показано, что у клеток крови достаточно мал разброс морфо-физических параметров нормальных форм относительно девиантных. Поэтому методы корреляционно-спектрального или интегрального частотного (интегральный пространственный – в существенно меньшей степени) анализа малоэффективны для построения изображений с безлинзового чипа. Причина кроется в том, что на одиночную клетку приходится малое количество пикселей, – это ведет к малой статистической достоверности (по выборке) анализа. Однако коррелографический подход как таковой работал намного лучше. Поэтому он оказался более предпочтителен в качестве метода анализа не только нормальных, но и девиантных форм клеток крови, включая мембранопатии. На рис. 7а внизу показан нормальный эритроцит (с инверсией контраста), а наверху – его коррелограмма, с явно оформленными деталями контраста. В случае анализа аморфного, с точки зрения чипа-анализатора, сгустка с достаточной оптической плотностью (рис. 7б – внизу) коррелограмма принимает характер частично упорядоченной

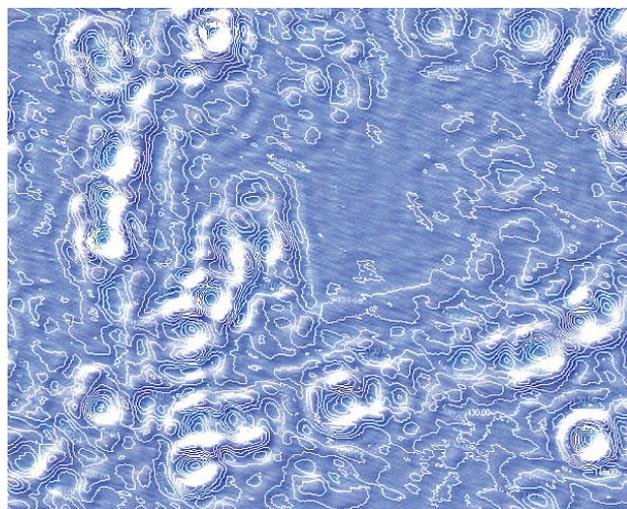


Рис. 5. *Rouleaux.* Образование стопок эритроцитов в дегидратирующей капле крови
Fig. 5. *Rouleaux.* Formation of red blood cell stacks in a dehydrating drop of blood

blood characteristics using the on-chip cytometer described above. Thus, in the early stages of dehydration of a blood drop (the first ten minutes; depending on the volume/thickness of the layer), it is possible to see the formation of these structures in situ on the chip in real time. The result of the corresponding observations is shown in Fig. 5. At the same time, it is possible with the kinetic quality (in dynamics and with positional sensitivity) to determine the aggregometric properties of the sample using the waveletgram of the corresponding cytometric patterns/files of registograms from a

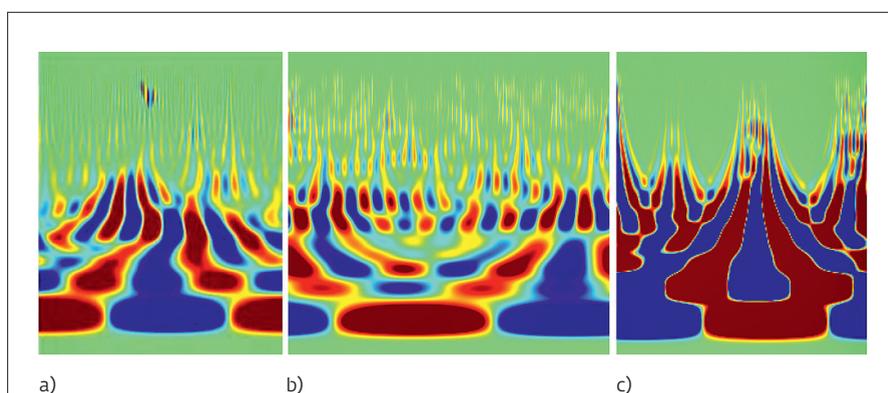


Рис. 6. Вейвлетограммы различных уровней агрегации клеток крови: а – норма; б – частичная агрегация (цепочка); с – полная агрегация (стопка)
Fig. 6. Waveletgrams of different levels of blood cell aggregation: a – norm; b – partial aggregation (chain); c – complete aggregation (stack)

структуры с большой долей диффузного "облака" (рис. 7b – верх). При обнаружении эритроцитов с измененной пропорцией и явным отклонением от сферической формы коррелограмма изменяется. В соответствии с полярностью ориентации данного форменного элемента на изображении (рис. 7c), также наблюдается при слипании нескольких не нормируемых по размеру клеток (например двух микросфероцитов). Когда в поле зрения (ROI) анализатора начинает формироваться "стопка" (но еще не столбик, который может содержать более десятка эритроцитов), картина коррелограммы качественно изменяется, демонстрируя пятна, возникшие в результате появления новых участников процесса на ROI (рис. 7d). Если на ROI фиксируется тень эритроцита, то ее коррелограмма имеет существенно менее выраженные пятна-полюса при сохранении центральной зоны той же структуры, что и у нормального эритроцита (рис. 7e). При наложении двух и более эритроцитов на кадре (без дополнительной адгезии/агрегации) есть возможность детектировать это по усилению отдельных зон пятен (см. рис. 7f), явных и для одиночного нормального эритроцита (рис. 7a). Причем на результат проекции будут влиять также взаимная ориентация эритроцитов, а также стратификация их на кадре (подлежащая и надлежащая клетка).

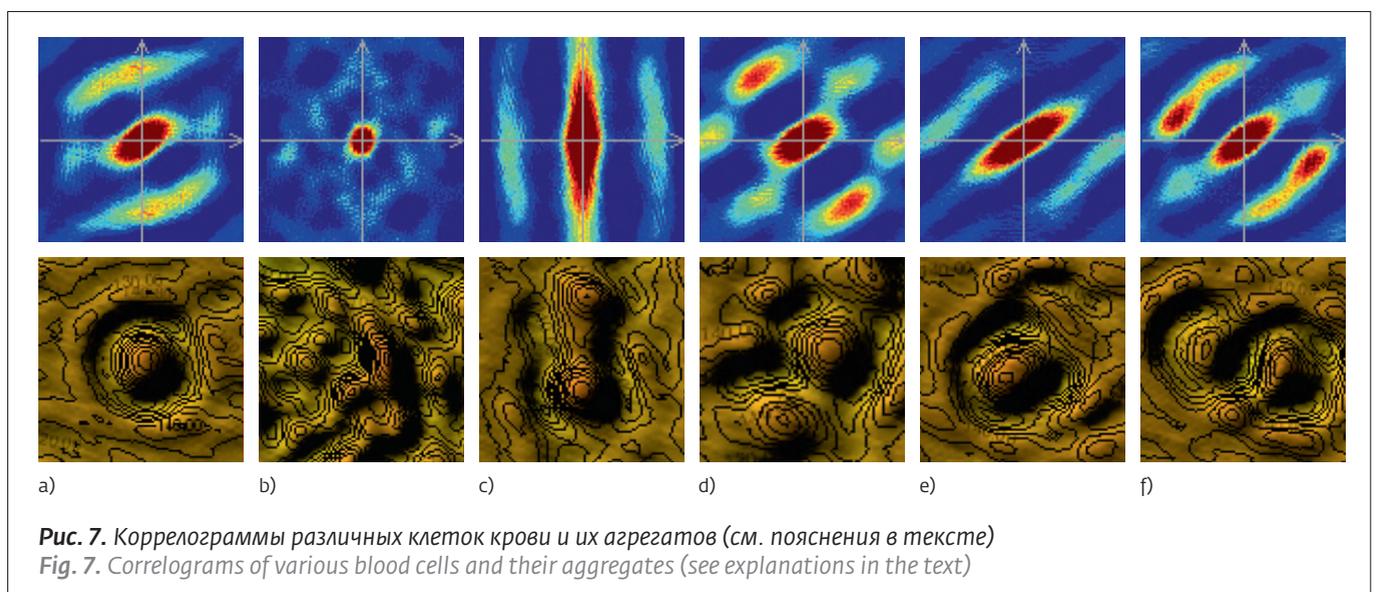
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показано, что методы безлинзовой гемоцитометрии на чипе, реализуемые в рамках упрощенной российской модели устройства и альтернативной фотометрической

lensless chip. The doctor does not have to own the data analysis technique, since the statistical results of the analysis of samples of blood cells passing through the analyzer can be understood from the simple morphological positions, with the exception that the subject of analysis and interpretation of the morphological picture is not micrographs, but waveletgrams. Fig. 6 shows the result of such an automatic distinction between the levels and stages of aggregation for different morphological types of pictures determined by the clinician: a is the norm, b is partial aggregation (which can be characterized as a "chain"), c is a complete aggregation ("stack").

3.3. Correlographic determination

To more accurately determine the classes of cells without using for this purpose standard morphometric databases, it is rational to have strict quantitative criteria for the differences of blood cells according to the analysis of their physical morphological properties. We have shown that the blood cells have a fairly small range of morphophysical parameters of normal forms, relatively to the deviant ones, therefore, correlation-spectral or integral frequency (and integral spatial – to a much lesser extent) analysis methods are ineffective for processing of images from a lensless chip. The reason lies in the fact that a single cell occupies a small number of pixels, which leads to a poor statistical reliability of the analysis. However, the correlographic approach as such worked much better. Therefore, it turned out to be more preferable as a method for analyzing not only normal, but also deviant forms





модели Ломмеля-Зелигера, позволяют не только визуализировать, причем в квадтрехмерном варианте, клетки крови, но и морфологически классифицировать их с использованием вейвлетных и коррелографических техник. В настоящее время начато тестирование их на выборке препаратов с клетками – индикаторами различных мембранопатий.

5. БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Российский фонд фундаментальных исследований за грантовую поддержку. Работа выполнена в рамках гранта РФФИ 16-32-00914\16.

ЛИТЕРАТУРА

1. Seo S., Su T.W., Erlinger A., Ozcan A. Multi-color LUCAS: Lensfree on-chip cytometry using tunable monochromatic illumination and digital noise reduction // Cellular and Molecular Bioengineering, 2008, v.1, № 2–3, p.146.
2. Su T.W., Seo S., Erlinger A., Tseng D., Ozcan A. Towards Wireless Health: Lensless On-Chip Cytometry // Optics and Photonics News, 2008, v. 19, № 12, p. 24.
3. Seo S., Su T.W., Tseng D.K., Erlinger A., Ozcan A. Lensfree holographic imaging for on-chip cytometry and diagnostics // Lab on a Chip, 2009, v. 9, № 6, p. 777–787.
4. Seo S., Isikman S.O., Sencan I., Mudanyali O., Su T.W., Bishara W. et al. High-throughput lens-free blood analysis on a chip // Analytical chemistry, 2010, v. 82, № 11, p. 4621–4627.
5. Stybayeva G., Mudanyali O., Seo S., Silangcruz J., Macal M., Ramanculov E. et al. Lensfree holographic imaging of antibody microarrays for high-throughput detection of leukocyte numbers and function // Analytical chemistry, 2010, v. 82, № 9, p. 3736–3744.
6. Coskun A.F., Su T.W., Ozcan A. Wide field-of-view lens-free fluorescent imaging on a chip // Lab on a Chip, 2010, v. 10, № 7, p. 824–827.
7. Oh C., Isikman S.O., Khademhosseini B., Ozcan A. On-chip differential interference contrast microscopy using lensless digital holography // Optics Express, 2010, v. 18, № 5, p. 4717–4726.
8. Bishara W., Su T.W., Coskun A.F., Ozcan A. Lensfree on-chip microscopy over a wide field-of-view using pixel super-resolution // Optics express, 2010, v. 18, № 11, p. 11181–11191.
9. Bishara W., Sikora U., Mudanyali O., Su T.W., Yaglidere O., Luckhart S. et al. Holographic pixel super-resolution in portable lensless on-chip microscopy using a fiber-optic array // Lab on a Chip, 2011, v. 11, № 7, p. 1276–1279.
10. Ozcan A. Biogames: a platform for crowd-sourced biomedical image analysis and tele-diagnosis // Bulletin of the Southern California Academy of Sciences, 2014, v. 113, № 2, p. 114.
11. Zhu H., Sencan I., Wong J., Dimitrov S., Tseng D., Nagashima K. et al. Cost-effective and rapid blood analysis on a cell-phone // Lab on a Chip, 2013, v. 13, № 7, p. 1282–1288.
12. Rivenson Y., Göröcs Z., Günaydin H., Zhang Y., Wang H., Ozcan A. Deep learning microscopy // Optica, 2017, v. 4, № 11, p. 1437–1443.
13. Rivenson Y., Zhang Y., Günaydin H., Teng D., Ozcan A. Phase recovery and holographic image reconstruction using deep learning in neural networks // Light:

of blood cells, including membranopathies. Fig. 7a below shows a normal erythrocyte (with contrast inversion), and at the top is its correlogram, with clearly defined details of contrast. In the case of analyzing an amorphous, from the point of view of the analyzer chip, agglomerate with sufficient optical density (Fig. 7b – bottom), the correlogram looks like a partially ordered structure with a large fraction of the diffuse "cloud" (Fig. 7b – top). When red blood cells are detected with a changed proportion and a clear deviation from the spherical shape, the correlogram changes in accordance with the polarity of orientation of this cell in the image (Fig. 7c). A similar effect is also observed when several cells that are not normalized in size (for example, two microspherocytes) stick together. When a "stack" begins to form in the region of interest (ROI) of the analyzer (but not yet a column that can contain more than a dozen red blood cells), the picture of the correlogram changes qualitatively, showing the spots created by the emergence of new structures in the ROI (Fig. 7d). If the erythrocyte shadow is fixed in the ROI, then its correlogram has significantly less pronounced spots-poles while maintaining the central zone of the same structure as that of the normal erythrocyte (Fig. 7e). When two or more erythrocytes are superimposed on the frame (without additional adhesion/aggregation), it is possible to detect this by strengthening specific zones of spots (see Fig. 7f), which are also evident for a single normal erythrocyte (Fig. 7a). Moreover, the result of the projection will also be influenced by the mutual orientation of red blood cells, as well as their stratification on the frame (underlying and overlying cell).

4. CONCLUSION

Thus, it is shown that methods of lensless on-chip hemocytometry, implemented in the framework of the simplified Russian model of the device and the alternative Lommel-Seeliger photometric model, allow not only to visualize blood cells, specifically in the quasi-three-dimensional version, but also morphologically classify them using wavelet and correlographic techniques. At present, they are being tested on the cell samples with various membranopathies.

5. ACKNOWLEDGMENTS

The authors express gratitude to the Russian Foundation for Basic Research (project 16-32-00914) for the financial support.



- Science & Applications, 2018 (in press); arXiv preprint arXiv:1705.04286.
14. **Нотченко А.В., Градов О.В.** Лазерный топологичный спекл-анализатор пролиферативной та дифференциальной активности в культуральном морфогенезе // Морфология, 2011, в. 5, № 4, р. 10–19.
Notchenko A.V., Gradov O.V. Lazernij topologichnij spekl-analizator prolifерativnoј ta diferencijalnoј aktivnosti v kul'tural'nomu morfogenezi // Morfologija, 2011, v. 5, № 4, p. 10–19.
 15. **Bolkhovitinov A.S., Gradov O.V.** Visualization of invariant sets of biomorphic dynamic systems // Mat. Morph., 2010; 9(3): 0421000004\0032.
 16. **Градов О.В., Нотченко А.В.** Загальнодоступні морфогістохімічні лабораторії на чипі на базі сіток рахункових камер різних типів: мікрофлюїдні морфодинамічні робочі станції // Морфология, 2012, в. 6, № 1, р. 5–19.
Gradov O.V., Notchenko A.V. Zagal'nodostupni morfogistohimichni laboratorii na chipi na bazi sitok rahunkovih kamer riznih tipiv: mikrofluidni morfodinamichni roboci stancii // Morfologija, 2012, v. 6, № 1, p. 5–19.
 17. **Нотченко А.В., Градов О.В.** Элементарные морфометрические лаборатории на чипе на основе гемцитометрических камер с радиочастотной идентификацией культур и трансляцией спектроскопально-гистохимического мониторинга // Журнал радиоэлектроники, 2012, № 2, URL: <http://jre.cplire.ru/win/feb12/5/text.html>
Notchenko A.V., Gradov O.V. Elementarnye morfometricheskie laboratorii na chipe na osnove gemocitometricheskikh kamer s radiochastotnoj identifikaciej kul'tur i translyaciej spektrozonal'no-gistohimicheskogo monitoringa // Zhurnal radioelektroniki, 2012, № 2, URL: <http://jre.cplire.ru/win/feb12/5/text.html>
 18. **Notchenko A.V., Gradov O.V.** Elementary morphometric labs-on-a-chip based on hemocytometric chambers with radiofrequency culture identification and relay of spectrozonal histochemical monitoring // Visualization, Image Processing and Computation in Biomedicine, 2013, Vol. 2, № 1, DOI: 10.1615/VisualizImageProcComputatBiomed.2013005968
 19. **Нотченко А.В., Градов О.В.** Пятиосная роботизированная лазерная система и алгоритм цифровой обработки выходных данных для регистрации и морфотопологической идентификации клеточно-тканевых структур в гистоморфогенезе // Журнал радиоэлектроники, 2012, № 1, URL: <http://jre.cplire.ru/jre/jan12/6/text.html>
 - Notchenko A.V., Gradov O.V.** Pyatiosnaya robotizirovannaya lazernaya sistema i algoritm cifrovoj obrabotki vyhodnyh dannyh dlya registracii i morfotopologicheskoy identifikacii kletочно-tkanevyh struktur v gistomorfogeneze // Zhurnal radioelektroniki, 2012, № 1, URL: <http://jre.cplire.ru/jre/jan12/6/text.html>
 20. **Notchenko A.V., Gradov O.V.** A five-axis arm-manipulator laser system & an algorithm for digital processing of output data for recording and morphotopological identification of cells and tissue structures // Visualization, Image Processing and Computation in Biomedicine, 2013, v. 2, № 1, DOI: 10.1615/VisualizImageProcComputatBiomed.2013005967
 21. **Gradov O., Gradova M., Rybakov S., Jae Choon S.** Inorganic Biomimetics for Clinical Hematology // Medical Health and Science Journal. 2010, v. 2, № 2, p. 10–17.
 22. **Gradov O.V., Jablov A. G.** Novel morphometrics-on-a-chip: CCD- or CMOS-lab-on-a-chip based on discrete converters of different physical and chemical parameters of histological samples into the optical signals with positional sensitivity for morphometry of non-optical patterns // Journal of Biomedical Technologies, 2016, № 2, p. 1–29.
 23. **Gradov O.V.** Multi-functional microprobe lab-on-a-chip based on the active-pixel sensor with the position-sensitive cassette masks assembled from discrete converters of different biophysical and biochemical parameters into the optical response signals [invited paper] // International Journal of Modern Physics: Advances in Theory and Applications, 2017, № 1, p. 23–28.
 24. **Gradov O.V., Jablov A. G.** Multiparametric lab-on-a-chip with multiple biophysical signal converters as a novel tool for experimental stem cell biology and control equipment for hematopoietic stem cell transplantation // Cellular Therapy and Transplantation, 2017, Vol. 6, № 3:20, p. 41–42.
 25. **Градов О.В., Яблоков А.Г.** Морфологический / морфофункциональный анализ для лимфологических задач в микрофлюидных чипах // Трансляционная медицина, 2017, Приложение № 3, с. 14. URL: <http://jre.cplire.ru/win/feb12/5/text.html>
Gradov O.V., Yablokov A. G. Morfofiziologicheskij / morfofunkcional'nyj analiz dlya limfologicheskikh zadach v mikrofluidnyh chipah // Translyacionnaya medicina, 2017, Prilozhenie № 3, p. 14.