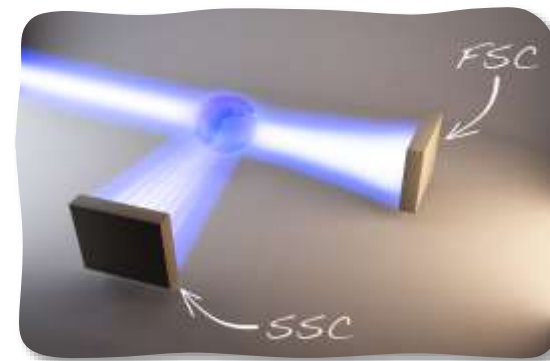
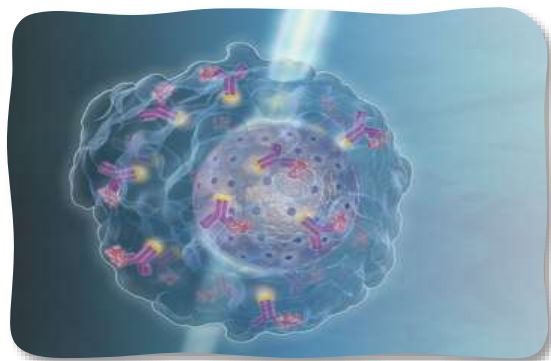
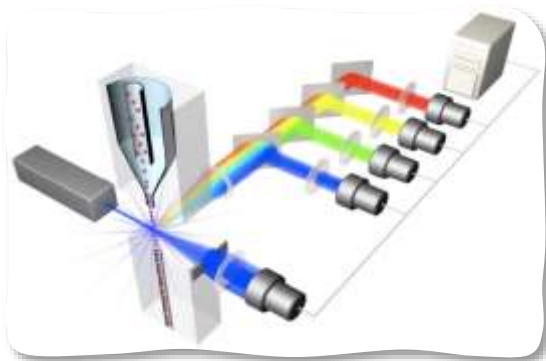




Αρχεία Δεδομένων και Ψηφιακή Επεξεργασία Σημάτων

Ιωάννης Δράκος, PhD (drakos@phd.gr)
Μηχανικός Η/Υ & Πληροφορικής



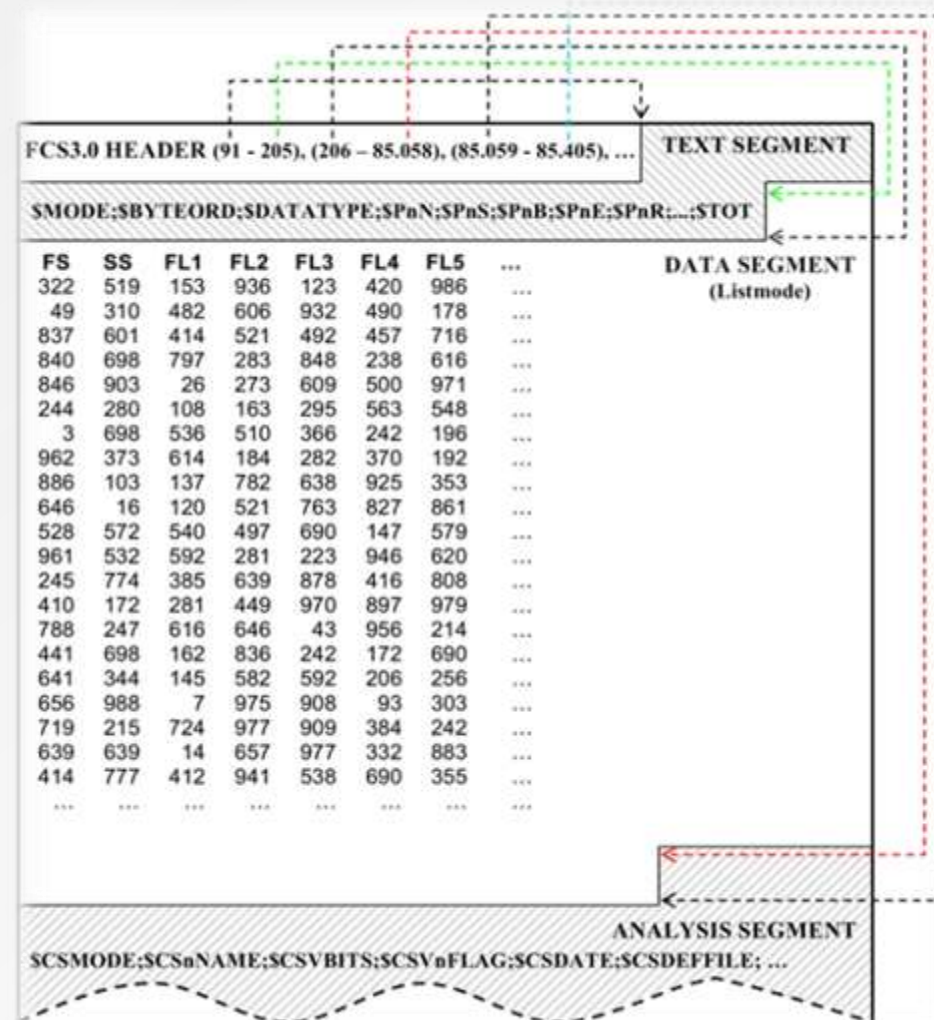
Ενότητες

- 1 Το πρότυπο Flow Cytometry Standard (FCS).....●
- 2 XML: eXtended Markup Language.....●
- 3 Μορφοποίηση Αρχείων Εικόνων.....●
- 4 Τα βασικά υποσυστήματα ενός ΚΡ.....●



Το πρότυπο Flow Cytometry Standard (FCS)

- Οριστικό από την International Society for Analytical Cytometry με στόχο να παρέχει ένα διάφανο πρωτόκολλο αποθήκευσης δεδομένων KP.
- Τα αρχεία που παράγονται βάσει του προτύπου FCS περιέχουν τρεις υποχρεωτικούς τομείς:
 - τον τομέα της κεφαλίδας,
 - τον τομέα κειμένου,
 - και τον τομέα των δεδομένων
- Και ένα ή περισσότερους προαιρετικούς τομείς
 - τον τομέα της ανάλυσης,
 - Ένα ή περισσότερους τομείς που ορίζει ο κατασκευαστής του κυτταρομετρητή





FCS: Header

- Αποτελεί την κεφαλίδα και βρίσκεται υποχρεωτικά στην αρχή κάθε αρχείου FCS
- Καταγράφει την έκδοση του προτύπου FCS που χρησιμοποιήθηκε για να δημιουργηθεί το εκάστοτε αρχείο και τις θέσεις των τομέων εντός του αρχείου.
- Παράδειγμα κεφαλίδας:

FCS2.0 **128** **926** **2048** **146199** **152704** **152729** **146304**

Περιεχόμενο Κεφαλίδας	Θέση Αρχής (χαρακτήρας)	Θέση Λήξης (χαρακτήρας)
Έκδοση FCS	FCS3.1 (1-6)	
Τομέας Κειμένου	128 (11-18)	926 (19-26)
Τομέας Δεδομένων	2048 (27-34)	146199 (35-42)
Τομέας Ανάλυσης	152704 (43-50)	152729 (51-58)
Τομέας Κατασκευαστή	146304	152667



FCS: Text Segment

- Ο τομέας κειμένου περιέχει δύο ενότητες με παραμέτρους οι οποίες περιγράφουν τα δεδομένα του αρχείου FCS καθώς και τα τεχνικά χαρακτηριστικά του κυτταρομετρητή, τις ρυθμίσεις του κυτταρομετρητή και το πρωτόκολλο της εκάστοτε μέτρησης.
- Η υποχρεωτική, πρώτη, ενότητα περιέχει παραμέτρους όπως:
 - **\$MODE** Data mode (list mode - preferred, histogram - deprecated).
 - **\$PAR** ο αριθμός των χρωμάτων που συμμετέχουν στην μέτρηση.
 - **\$PnB** η ανάλυση του κυτταρομετρητή (10bits, 12bits, κλπ).
 - **\$PnE** το είδος της ενίσχυσης για κάθε κανάλι (n)
 - **\$PnN** το όνομα του αντιγόνου που μετριέται στο κανάλι (n)
 - **\$PnR** το εύρος των τιμών για το κανάλι (n) (1024, 4096, κλπ).
 - **\$TOT** ο συνολικός αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκαν.



FCS: Text Segment

- Η προαιρετική, δεύτερη, ενότητα του τομέα κειμένου περιέχει παραμέτρους όπως:
 - **\$EXP** το όνομα του πρωτοκόλλου
 - **\$FIL** το όνομα του FCS αρχείου
 - **\$OP** το όνομα του χειριστή του κυτταρομετρητή
 - **\$SRC** η προέλευση του δείγματος που αναλύεται
 - **\$SYS** το λειτουργικό σύστημα του υπολογιστή
 - **\$DATE** η ημερομηνία της μέτρησης
 - **\$CYT** ο τύπος του κυτταρομετρητή
 - **\$PnF** το οπτικό φίλτρο που χρησιμοποιήθηκε στο κανάλι (n)
 - **\$PnV** η τάση ρεύματος στον ανιχνευτή του καναλιού (n)
 - **\$LOST** ο αριθμός των κυττάρων που δεν αναλύθηκαν
 - **\$COM** σχόλια



FCS: Data Segment

- Ο τομέας των δεδομένων ενός FCS αρχείου περιέχει τις τιμές που μετρήθηκαν για το εκάστοτε κύτταρο (event).
- Π.χ. Κύτταρο 38, τιμή **FS**: 322, τιμή **SS**: 519, τιμή **FL1**: 153, τιμή **FL2**: 936 , τιμή **FL3**: 123 , τιμή **FL4**: 420, κοκ.
- Ποιο μονοκλωνικό (FL - Fluorescence) αντιστοιχεί σε κάθε κανάλι περιγράφεται στην τομέα κειμένου που προηγήθηκε.

FCS3.0 HEADER (91 - 205), (206 - 85,058), (85,059 - 85,405), ...										TEXT SEGMENT
SMODE;SBYTEORD;SDATATYPE;SPaN;SPaS;SPaB;SPaE;SPaR;...;STOT										
FS	SS	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5	...	DATA SEGMENT (Listmode)		
322	519	153	936	123	420	986	...			
49	310	482	606	932	490	178	...			
837	601	414	521	492	457	716	...			
840	698	797	283	848	238	616	...			
846	903	26	273	609	500	971	...			
244	280	108	163	295	563	548	...			
3	698	536	510	366	242	196	...			
962	373	614	184	282	370	192	...			
886	103	137	782	638	925	353	...			
646	16	120	521	763	827	861	...			
528	572	540	497	690	147	579	...			
961	532	592	281	223	946	620	...			
245	774	385	639	878	416	808	...			
410	172	281	449	970	897	979	...			
788	247	616	646	43	956	214	...			
441	698	162	836	242	172	690	...			
641	344	145	582	592	206	256	...			
656	988	7	975	908	93	303	...			
719	215	724	977	909	384	242	...			
639	639	14	657	977	332	883	...			
414	777	412	941	538	690	355	...			
...	...	...	...	...	...	...	...			
SCSMODE;SCSaNAME;SCSVBITS;SCSVbFLAG;SCSDATE;SCSDEFFILE; ...										ANALYSIS SEGMENT



FCS: Analysis Segment

- Ο, προαιρετικός, τομέας της ανάλυσης περιέχει τα αποτελέσματα πιθανών αναλύσεων που μπορούν να παραχθούν από το συνοδευτικό λογισμικό κάθε κυτταρομετρητή όπως:
 - **Επιλογές υποπληθυσμών (gating)**
 - **Ορισμός κατωφλιών για θετικές/αρνητικές εκφράσεις**
 - **Χαρακτηριστικές τιμές (μέση τιμή, τυπική απόκλιση, ελάχιστο, μέγιστο, κα.)**



XML: eXtended Markup Language

- Η XML είναι μία γλώσσα σήμανσης και μπορεί να περιγράψει διαδικασίες, κανόνες, πρωτόκολλα, κείμενα, εικόνες, ... κλπ. χρησιμοποιώντας ένα διαφορετικά ορισμένο λεξικό για κάθε περίπτωση:
 - Ορίζεται, κυρίως, στην προδιαγραφή XML 1.0 (XML 1.0 Specification), που δημιούργησε ο διεθνής οργανισμός προτύπων W3C (World Wide Web Consortium).
 - Η XML σχεδιάστηκε δίνοντας έμφαση στην απλότητα, τη γενικότητα και τη χρησιμότητα στο Διαδίκτυο.
- Παράδειγμα αρχείου XML:

```
<?xml version="1.0"?>
<quiz>
  <question>
    Τι είναι η γλώσσα XML;
  </question>
  <answer>
    Μία γλώσσα σήμανσης, η οποία δεν θα έπρεπε να παιδεύει τα μέλη της ΕΕΚ
  </answer>
</quiz>
```



Μορφοποίηση Αρχείων Εικόνων

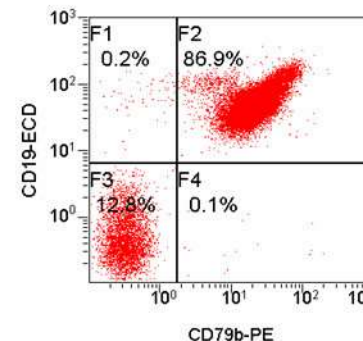
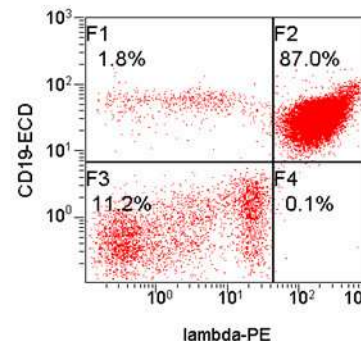
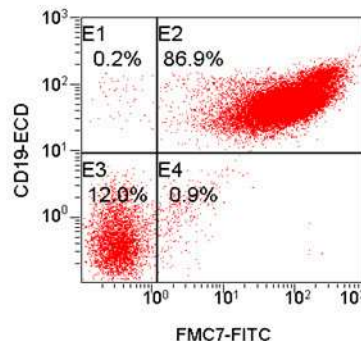
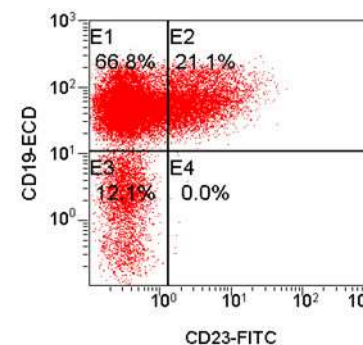
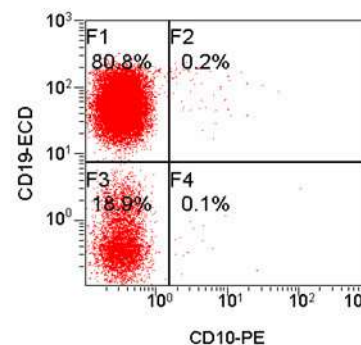
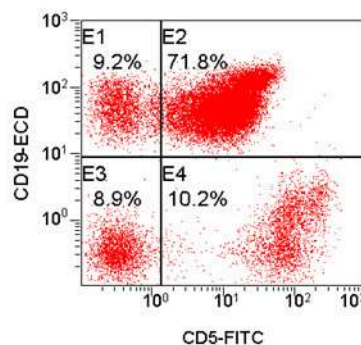
- Οι μορφοποιήσεις αρχείων εικόνας αποτελούν τυποποιημένα πρωτόκολλα για την οργάνωση και αποθήκευση εικόνων:
 - JPEG/JFIF, JPEG 2000, Exif, TIFF,
 - RAW, GIF, BMP, PNG, PPM, PGM,
 - PBM, PNM, PFM, PAM, WEBP
- Ένα πρωτόκολλο μορφοποίησης μπορεί να επιτρέπει τη συμπίεση των δεδομένων μίας εικόνας ή/και την επισύναψη πληροφοριών που περιγράφουν την εικόνα.
- Στο βιο-ιατρικό χώρο είναι σημαντικό να γνωρίζετε ότι η συμπίεση εικόνας χωρίζεται σε δύο βασικές κατηγορίες:
 - Τη συμπίεση χωρίς απώλεια πληροφοριών (π.χ. PNG, TIFF, RAW, BMP)
 - Τη συμπίεση με απώλεια πληροφοριών (π.χ. JPEG)



Μορφοποίηση Αρχείων Εικόνων

- Οι μορφοποιήσεις με συμπίεση χωρίς απώλεια δημιουργούν αρχεία μεγαλύτερου μεγέθους, αλλά δεν αλλοιώνουν την εικόνα. Η συμπίεση με απώλεια δημιουργεί μικρότερα αρχεία, αλλά αλλοιώνει την εικόνα.

Αρχείο PNG, 403kB
 Συμπίεση μεγέθους
 αρχείου χωρίς
 απώλειες στην
 πληροφορία της
 εικόνας.
 (μέγεθος αρχείου
 χωρίς συμπίεση:
 1622 kB)

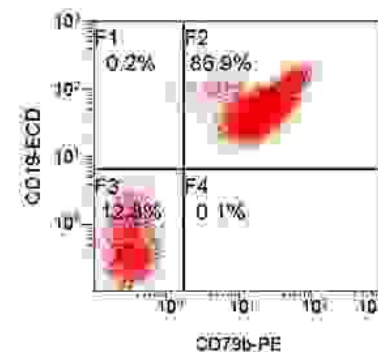
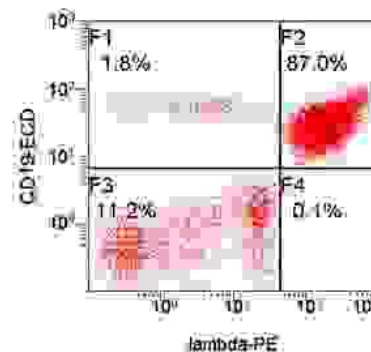
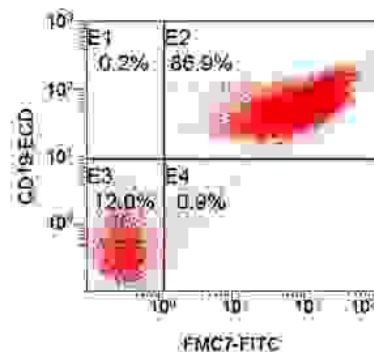
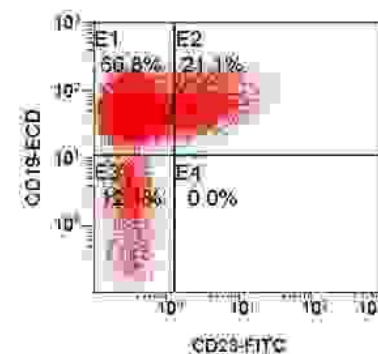
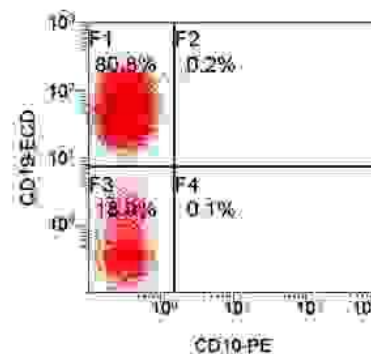
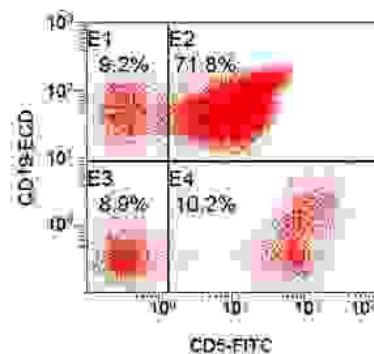




Μορφοποίηση Αρχείων Εικόνων

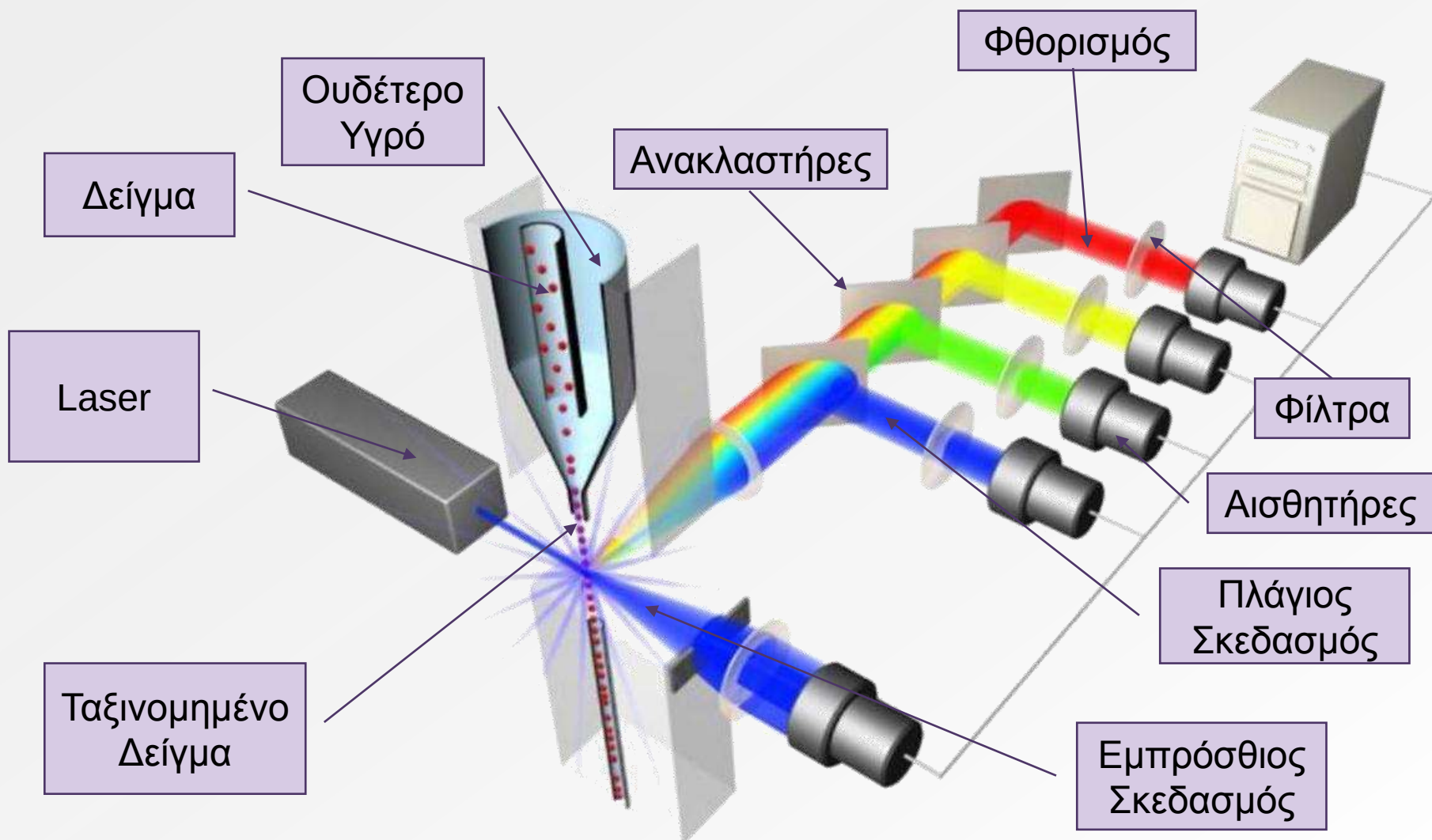
- Οι μορφοποιήσεις με συμπίεση χωρίς απώλεια δημιουργούν αρχεία μεγαλύτερου μεγέθους, αλλά δεν αλλοιώνουν την εικόνα. Η συμπίεση με απώλεια δημιουργεί μικρότερα αρχεία, αλλά αλλοιώνει την εικόνα.

Αρχείο JPG 32,5 kB
 Συμπίεση μεγέθους
 αρχείου με
 απώλειες στην
 πληροφορία της
 εικόνας.
 (μέγεθος αρχείου
 χωρίς συμπίεση:
 1622 kB)





Τα βασικά υποσυστήματα ενός ΚΡ

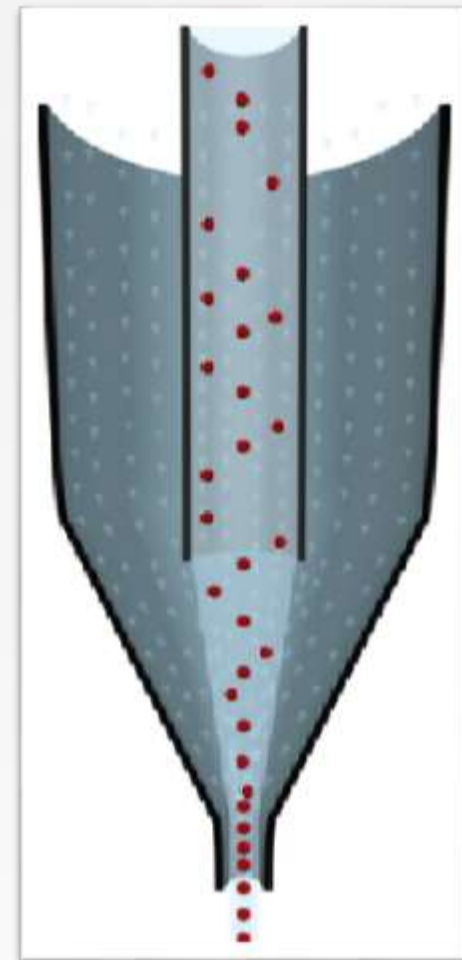




Τα βασικά υποσυστήματα ενός ΚΡ

■ Ρευστοδυναμική

- Κατά την εισαγωγή του δείγματος στον Κ.Ρ. τα κύτταρα βρίσκονται τυχαίως κατανομημένα στο εναιώρημα.
- Για να είναι δυνατή η ανάλυση των κυττάρων πρέπει αυτά να οδηγηθούν στην περιοχή εξέτασης διατεταγμένα σε σειρά (το ένα πίσω από το άλλο).
- Αρχικά το δείγμα εισέρχεται υπό πίεση σε ένα μικρό κανάλι.
- Το κανάλι αυτό βρίσκεται στο κέντρο ενός μεγαλύτερου κωνικού σωλήνα, τον οποίο διατρέχει ουδέτερο υγρό χαμηλότερης πίεσης.
- Η διαφορά πίεσης και ταχύτητας ανάμεσα στα υγρά των 2 σωλήνων αναγκάζουν τα κύτταρα που εξέρχονται του μικρού σωλήνα να διαταχθούν σε σειρά (φαινόμενο υδροδυναμικής εστίασης).

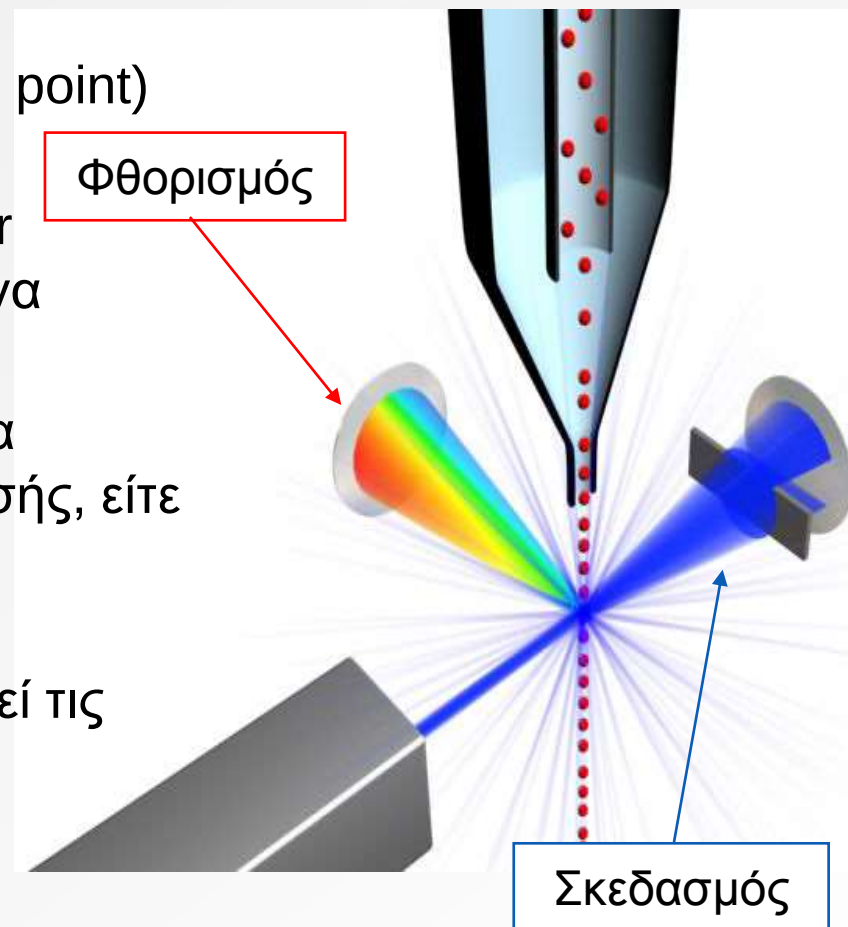




Τα βασικά υποσυστήματα ενός ΚΡ

■ Σημείο Εξέτασης

- Το σημείο εξέτασης (interrogation point) είναι η καρδιά του Κ.Ρ.
- Είναι το σημείο που η δέσμη laser διασταυρώνεται με τα διατεταγμένα κύτταρα
- Κατά την πρόσκρουση τα κύτταρα εκπέμπουν φως είτε λόγω σκέδασής, είτε λόγω φθορισμού.
- Το παραγόμενο φως, μετά από επεξεργασία και ανάλυση αποτελεί τις μετρήσεις ενός Κ.Ρ.

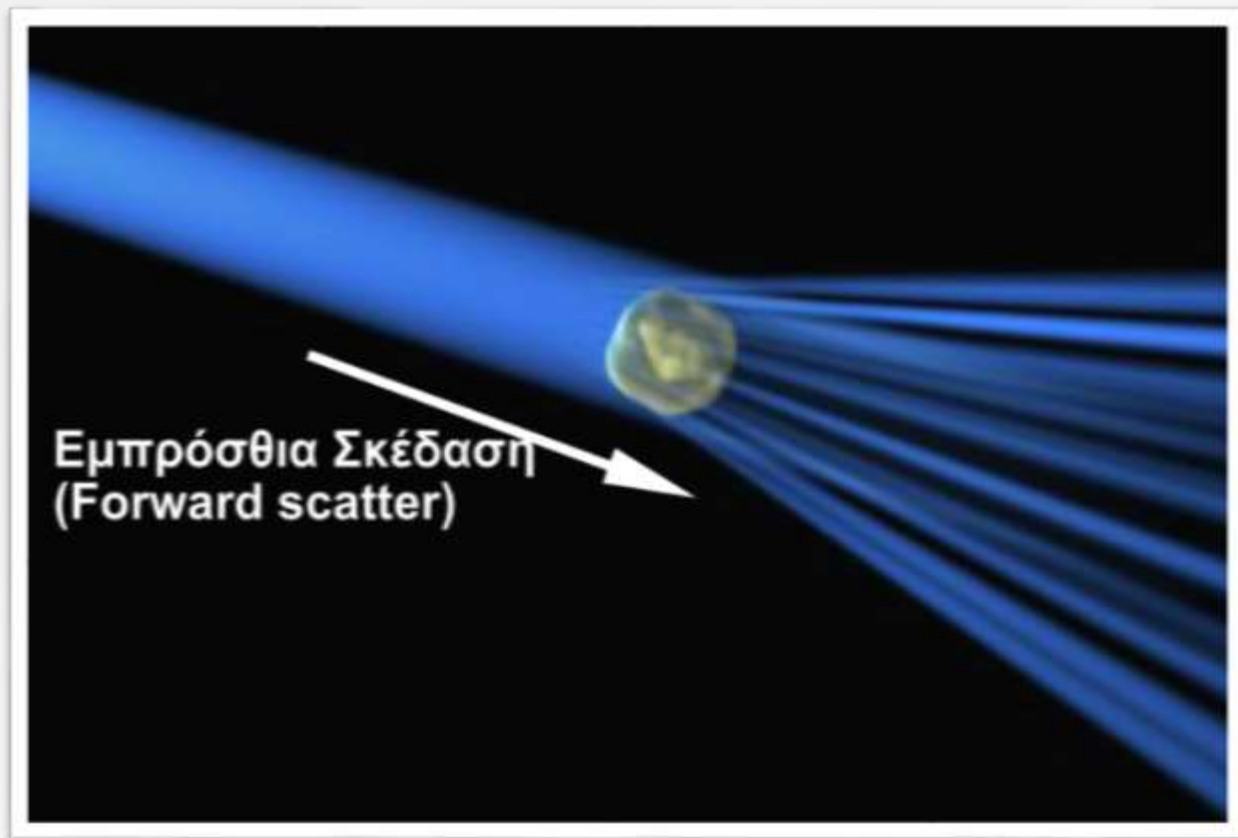




Τα βασικά υποσυστήματα ενός ΚΡ

■ Εμπρόσθια Σκέδαση

- Το φως κατά την πρόσκρουσή του με κάθε κύτταρο σκεδάζεται προς όλες τις κατευθύνσεις.
- Το σκεδασμένο φως που συνεχίζει να κινείται προς την ίδια κατεύθυνση με την αρχική ακτίνα ονομάζεται Εμπρόσθια Σκέδαση.
- Η Εμπρόσθια Σκέδαση φανερώνει χαρακτηριστικά σχετικά με το μέγεθος των κυττάρων.

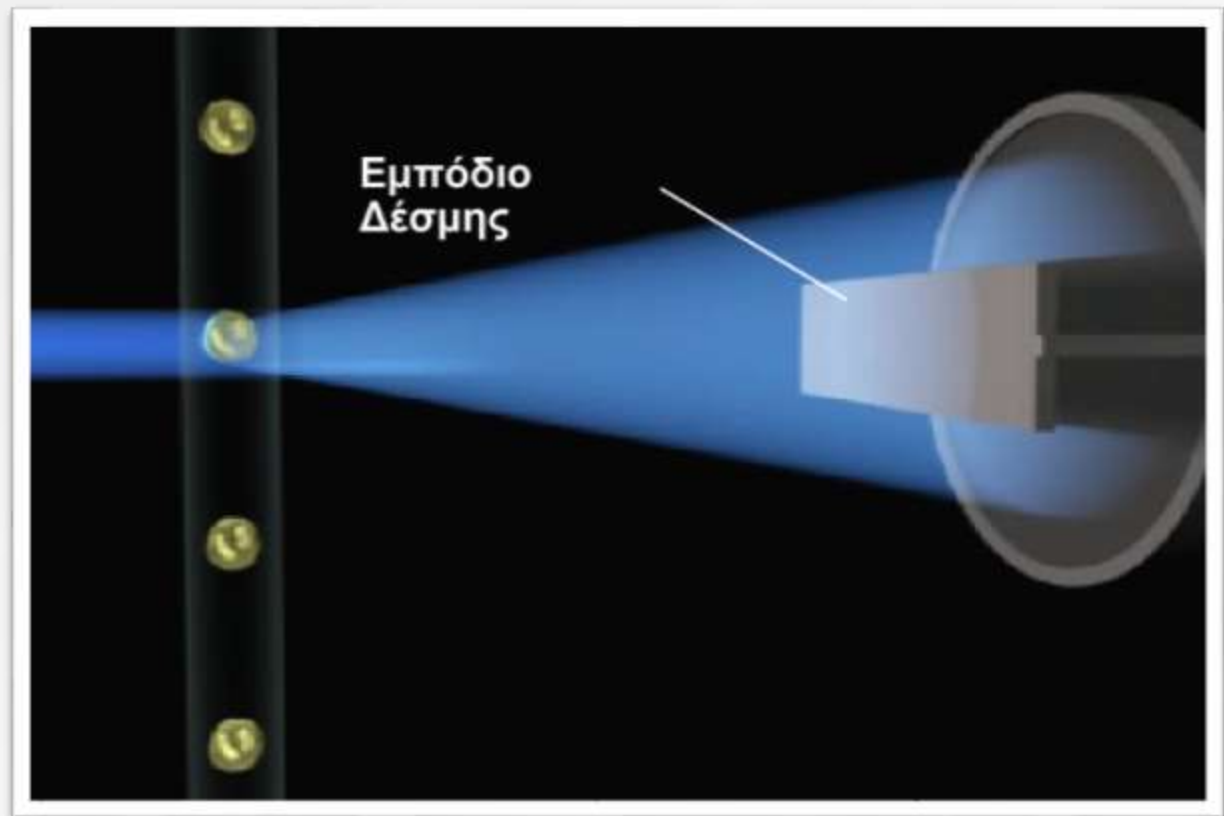




Τα βασικά υποσυστήματα ενός ΚΡ

■ Αισθητήρες Τάσης

- Η σκέδαση του φωτός οδηγεί μέρος της αρχικής δέσμης σε μία φωτοβολταϊκή διάταξη.
- Ένα σταθερό εμπόδιο αποτρέπει τη δέσμη από το να έρθει σε επαφή με τον αισθητήρα, χωρίς το φαινόμενο της σκέδασης.





Τα βασικά υποσυστήματα ενός ΚΡ

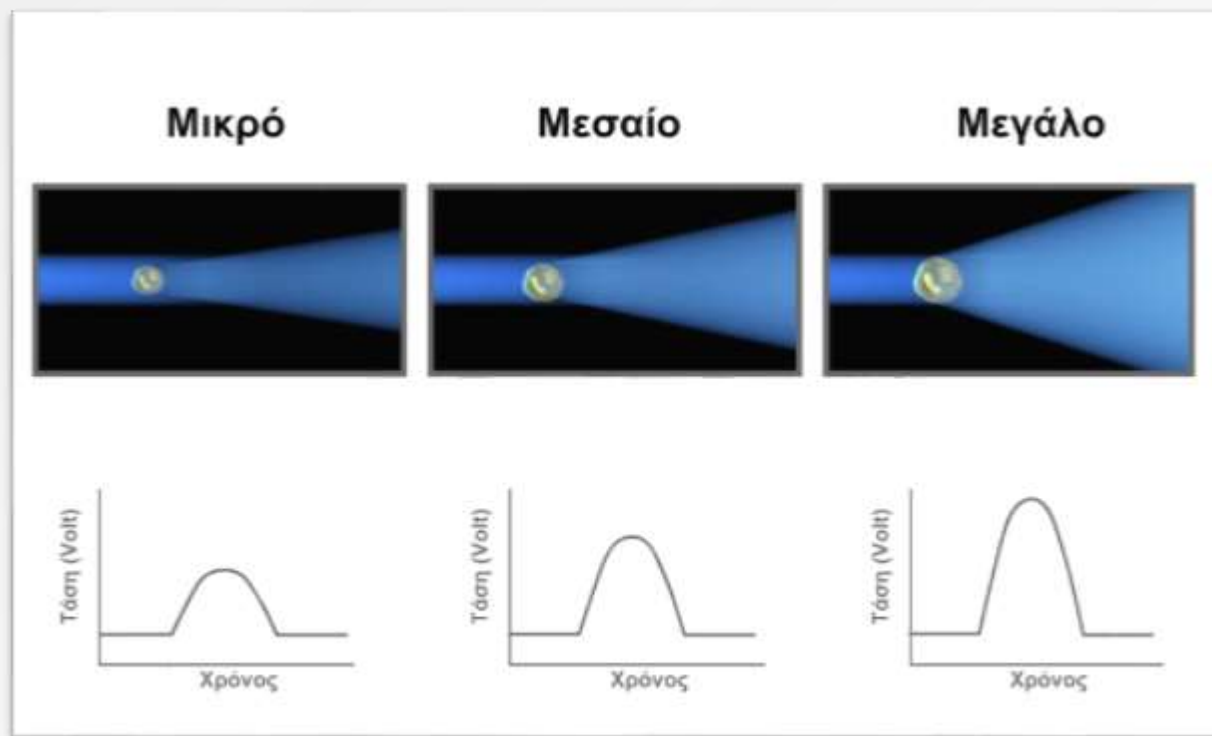
- Αποκατάσταση Βασικής Γραμμής
 - Η τάση που μετριέται σε ένα φωτοβολταϊκό αισθητήρα όταν δε λαμβάνει καμία δέσμη σκέδασης (τάση θορύβου) δεν είναι ποτέ μηδενική λόγω:
 - Παρεμβολών από γειτονικές διατάξεις
 - Ατέλειες στην κατασκευή του αισθητήρα
 - Του ηλεκτρονικού θορύβου που υπάρχει στη φύση
 - Σε ορισμένες περιπτώσεις η τάση που δημιουργούν πολύ ασθενείς σκεδάσεις είναι παραπλήσια στην τάση θορύβου.
 - Για τον λόγο αυτό κάθε εταιρία που κατασκευάζει κυτταρομετρητές έχει αναπτύξει τους δικούς της αλγόριθμους «Αποκατάστασης Βασικής Γραμμής» ώστε να φιλτράρεται η τάση θορύβου χωρίς να εξαιρούνται από τις μετρήσεις οι ασθενές σκεδάσεις.



Τα βασικά υποσυστήματα ενός ΚΡ

■ Εμπρόσθια Σκέδαση (συνέχεια)

- Ανάλογα με το μέγεθος κάθε σωματιδίου η σκέδαση του φωτός παράγει και ανάλογη τάση στον ειδικό αισθητήρα.
- Οι τιμές των κορυφών στη γραφική παράσταση τάσης/χρόνου αντιστοιχούν στο πλήθος των κυττάρων που συμμετείχαν στο πείραμα.





Τα βασικά υποσυστήματα ενός ΚΡ

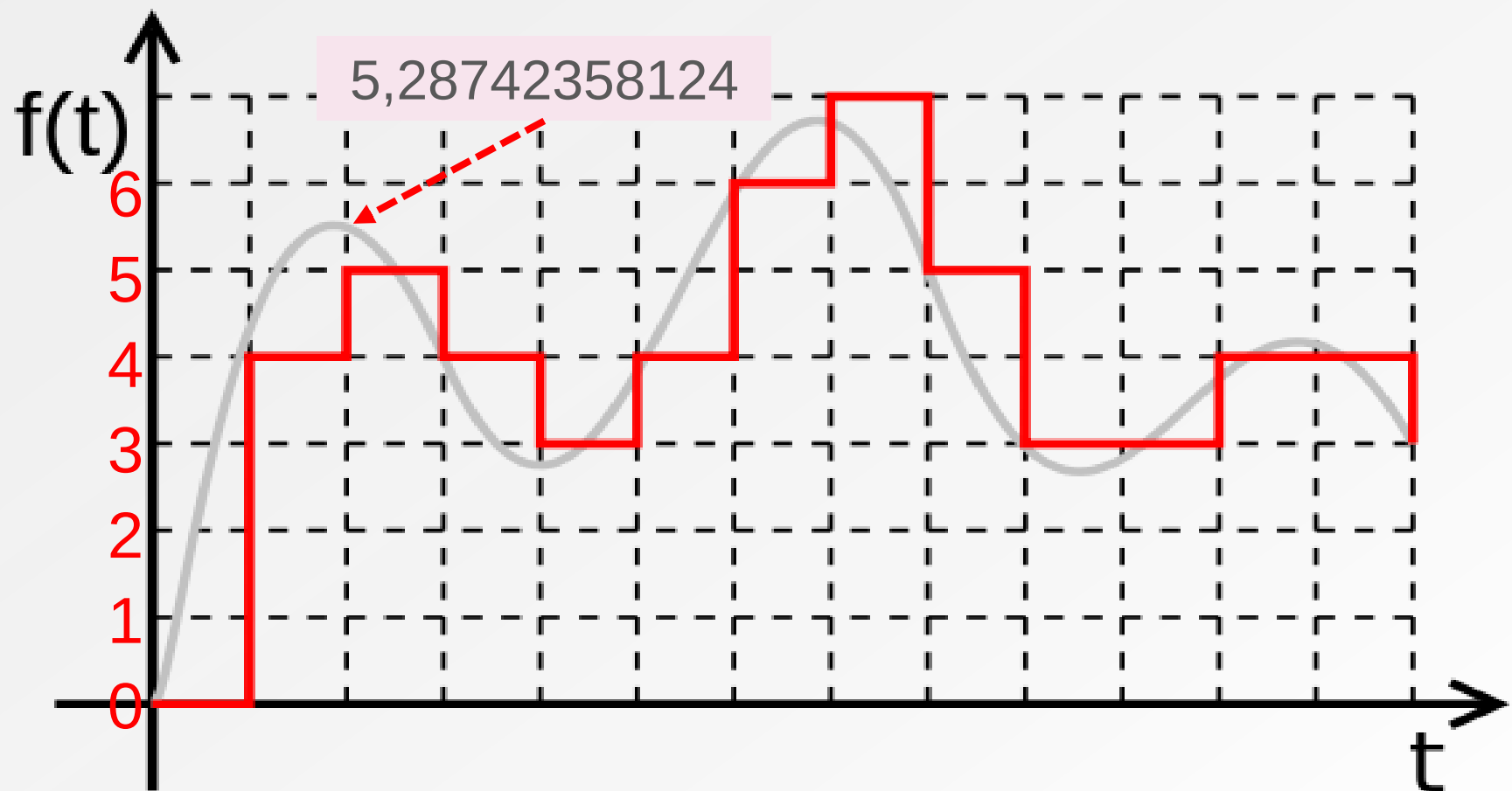
■ Data Binning

- Ονομάζεται η τεχνική αντιστοίχισης ενός σετ τιμών μεγαλύτερης ακρίβειας σε ένα σετ τιμών μικρότερης ακρίβειας (π.χ. αντιστοίχιση δεκαδικών αριθμών σε ακαίρους)
- Οι πιθανές τιμές τάσης που μπορεί να καταγράψει ένας αισθητήρας ΚΡ είναι πρακτικά άπειρες (συμπεριλαμβανομένων και των δεκαδικών υποδιαϊρέσεων).
- Οι τιμές τάσης που μπορεί να επεξεργαστεί ένας ηλεκτρονικός υπολογιστής είναι πάντοτε πεπερασμένες.
- Για τον λόγο αυτό κάθε εταιρία που κατασκευάζει κυτταρομετρητές έχει αναπτύξει τους δικούς της αλγόριθμους «Data Binning», ώστε οι αναλογικές τιμές τάσης που καταγράφονται στους αισθητήρες ενός ΚΡ να αντιστοιχούνται στις ψηφιακές τιμές που μπορεί να επεξεργαστεί ένας ΗΥ, χωρίς ουσιαστικές απώλειες στην ακρίβεια των μετρήσεων.



Τα βασικά υποσυστήματα ενός ΚΡ

- Data Binning (συνέχεια)

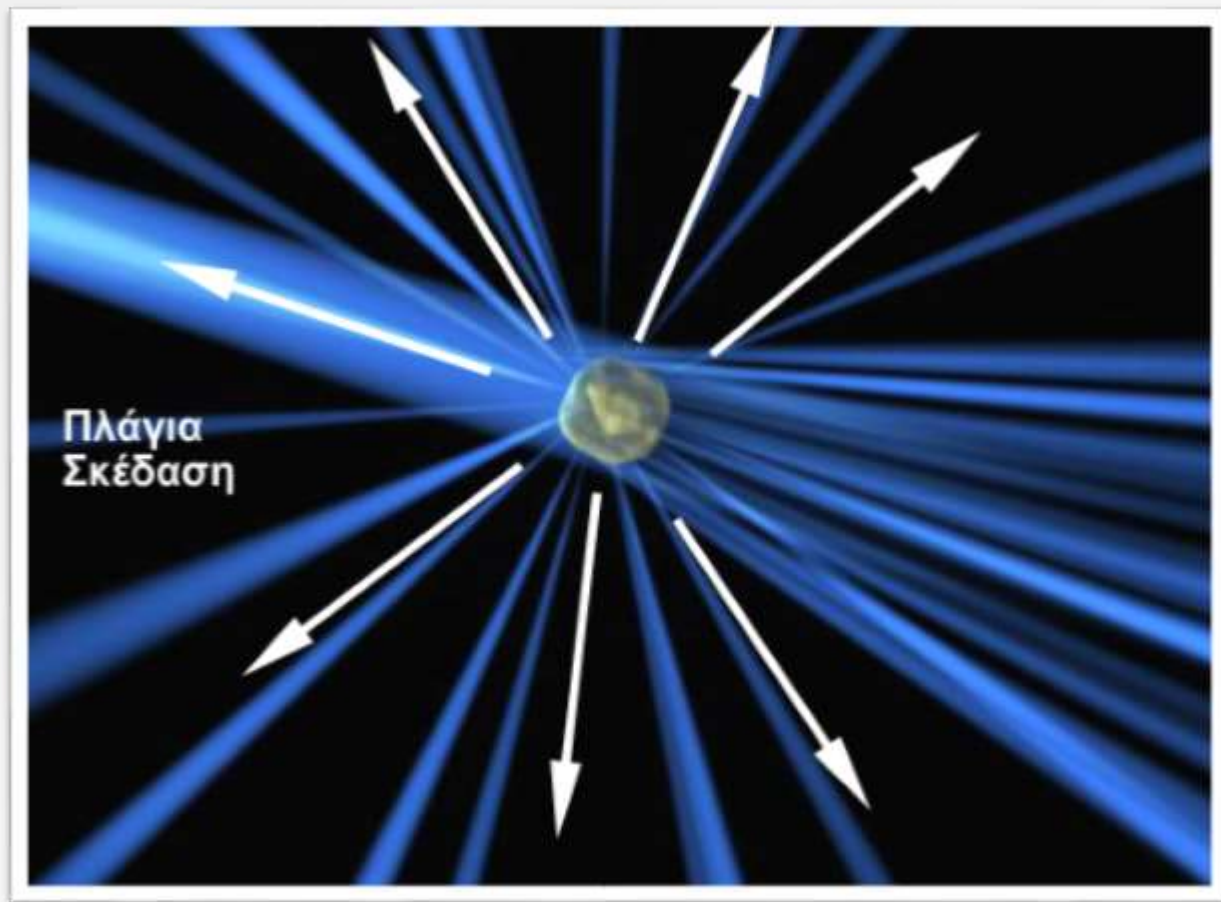




Τα βασικά υποσυστήματα ενός ΚΡ

■ Πλάγια Σκέδαση

- Κατά την πρόσκρουση ενός κυττάρου στο laser σκεδάζεται φως προς όλες τις κατευθύνσεις.
- Το φως που σκεδάζεται σε μεγάλες γωνίες προκαλείται από την κοκκίωση και τη δομική πολυπλοκότητα του εσωτερικού κάθε κυττάρου.
- Αυτού του είδους το φως ονομάζεται Πλάγια Σκέδαση και συνήθως συλλέγεται στις 90°.

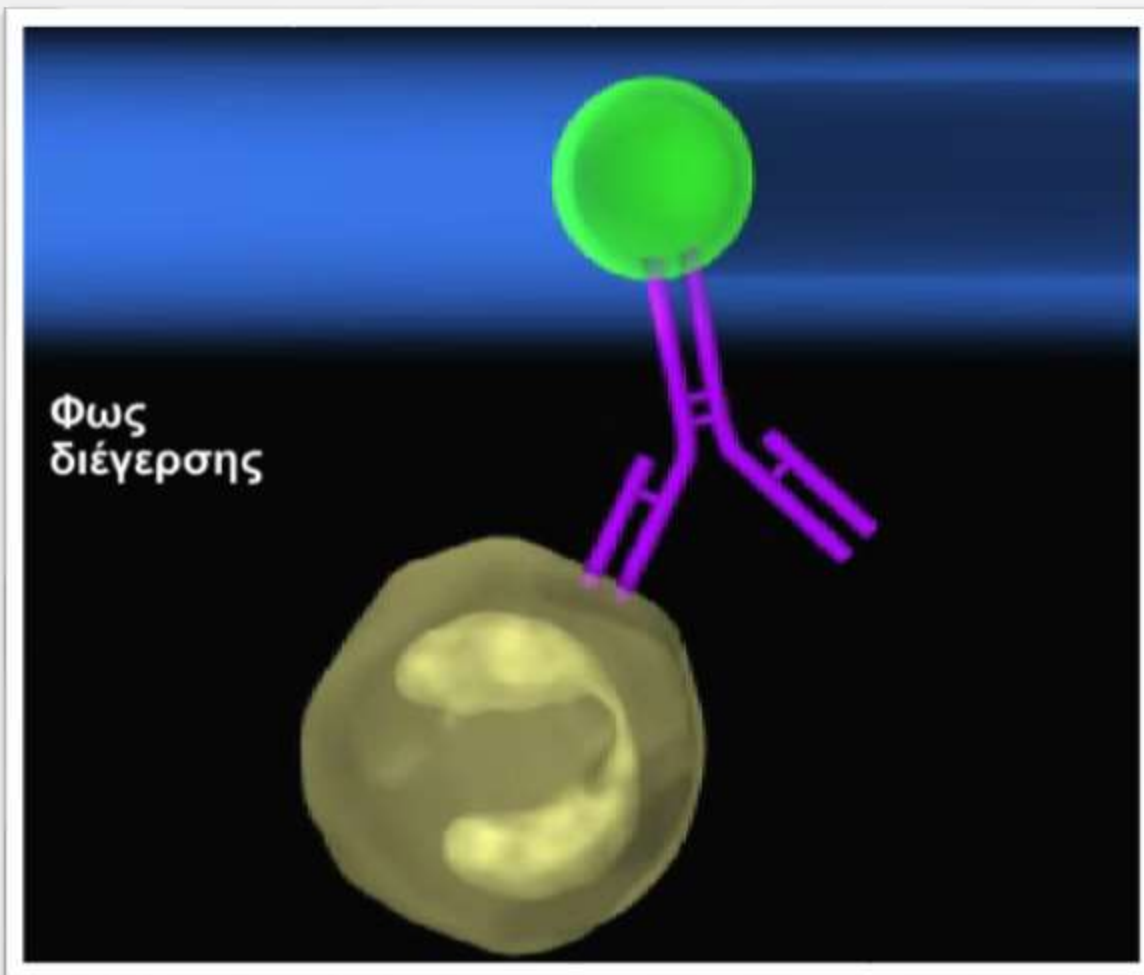




Τα βασικά υποσυστήματα ενός ΚΡ

■ Προετοιμασία Δείγματος

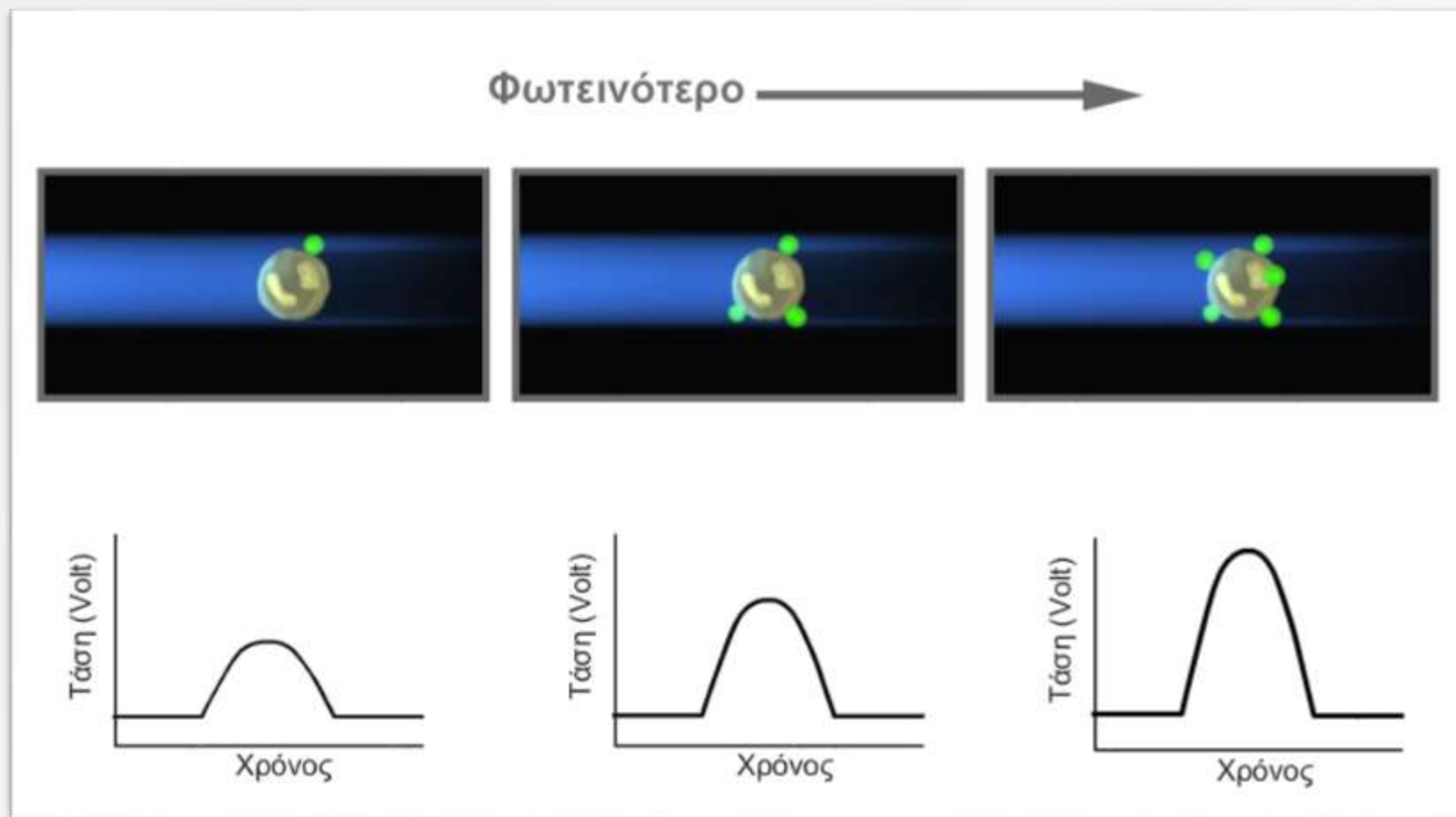
- Συγκεκριμένα αντισώματα επιλέγονται, ανάλογα με τις ιδιότητες (αντιγόνα) των κυττάρων που επιθυμούμε να ελέγξουμε.
- Στα επιλεγμένα αντισώματα προστίθεται φθορίζουσα ουσία που τα καθιστά ανιχνεύσιμα από τον Κ.Ρ.
- Τα κύτταρα τοποθετούνται σε ουδέτερο διάλυμα μαζί με τα αντισώματα ικανό χρόνο ώστε τα αντισώματα να προσκολληθούν στα αντίστοιχα αντιγόνα των κυττάρων.





Τα βασικά υποσυστήματα ενός ΚΡ

- Ανίχνευση φθορισμού – αντιγόνων

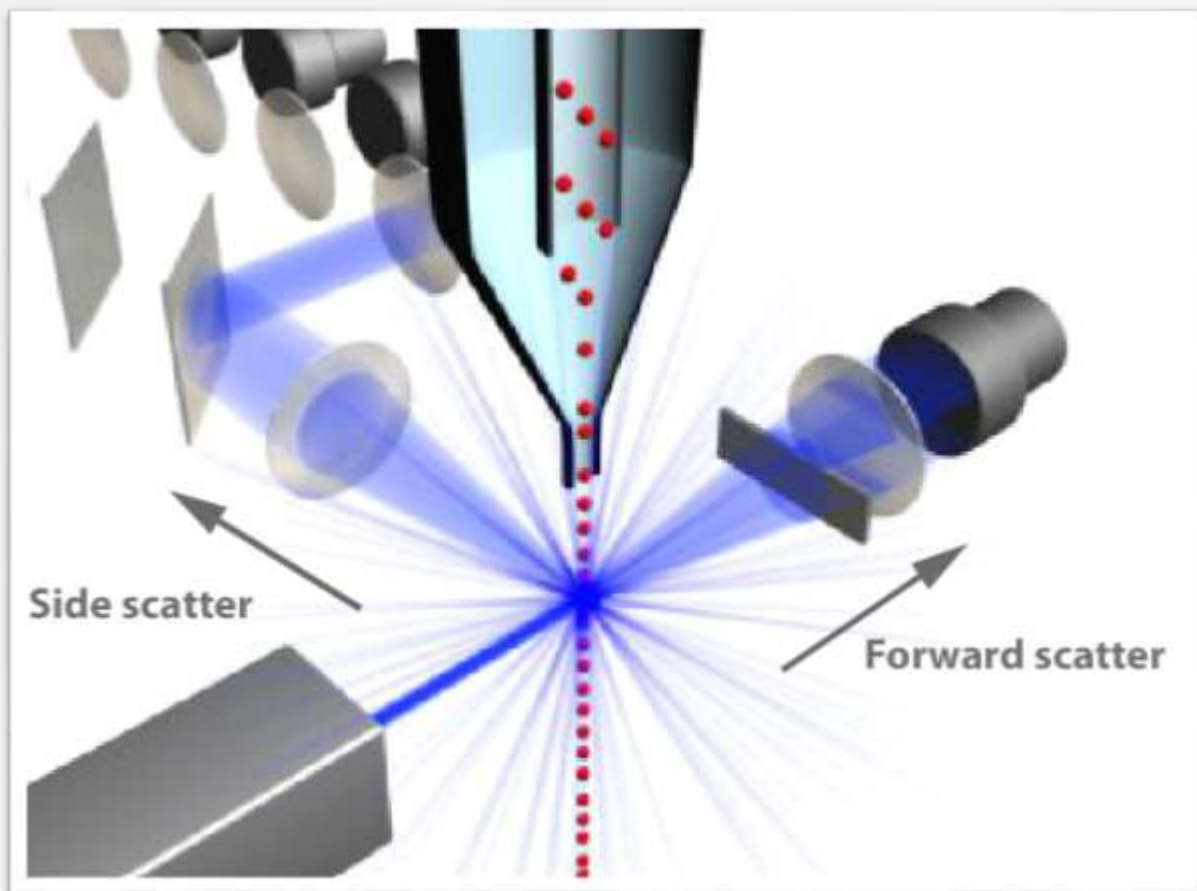




Τα βασικά υποσυστήματα ενός ΚΡ

■ ΟΠΤΙΚΗ

- Ο ΚΡ εμπεριέχει πλήθος οπτικών διατάξεων για την διαχείριση της δέσμης laser πριν και μετά την πρόσκρουση με τα κύτταρα.
- Τα οπτικά συστήματα ενός ΚΡ χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες:
 - Κάτοπτρα, τα οποία χρησιμεύουν στην εστίαση και πλοήγηση των οπτικών σημάτων.
 - Φίλτρα, τα οποία χρησιμεύουν στο διαχωρισμό του φωτός σε δέσμες συγκεκριμένου χρώματος (μήκους κύματος)

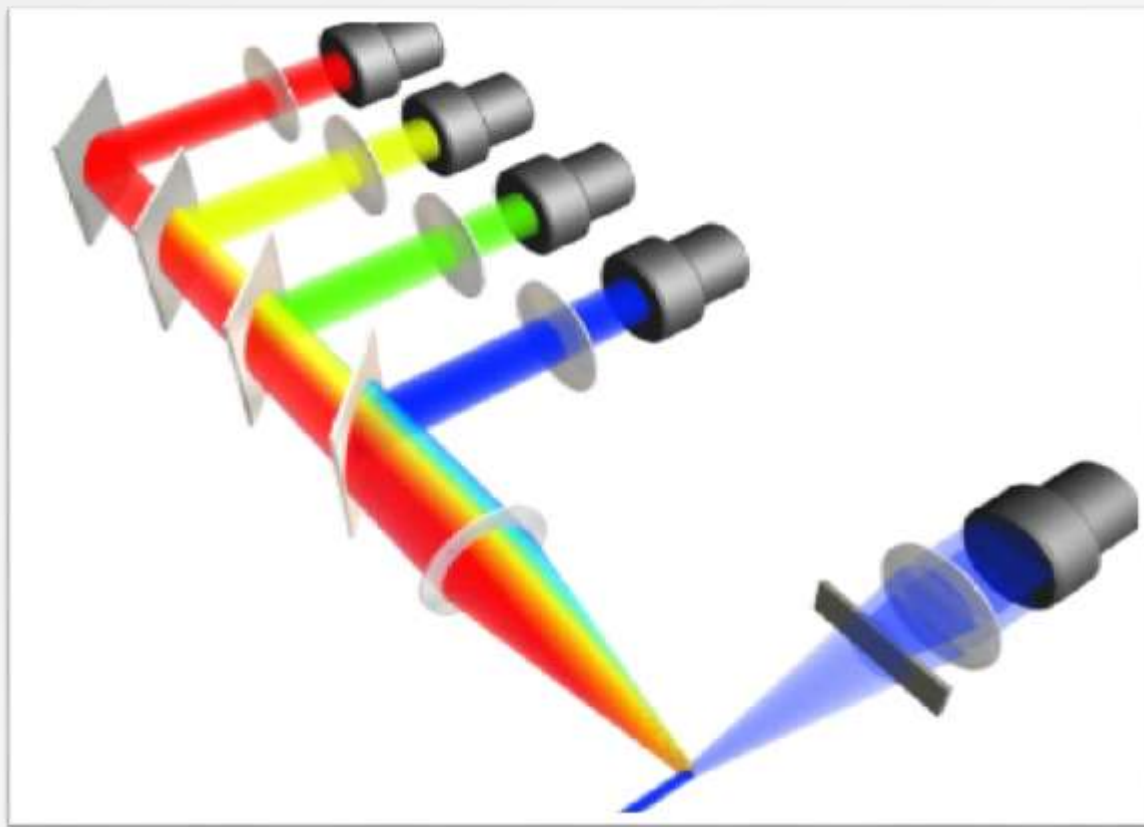




Τα βασικά υποσυστήματα ενός ΚΡ

■ Οπτικά Φίλτρα

- Οι φθορίζουσες ουσίες με τις οποίες συνδέονται (βάφονται) τα αντισώματα εκπέμπουν φως διαφορετικού μεν χρώματος (φάσματος), αλλά με επιμέρους επικαλύψεις.
- Π.χ. η πράσινη φθορίζουσα «Alexa Fluor 488» επικαλύπτει μέρος της, γειτονικού χρώματος (φάσματος), κόκκινης φθορίζουσας R-PE και το αντίστροφο.
- Για το λόγο αυτό πριν το φως φτάσει στον εκάστοτε αισθητήρα φιλτράρεται, ώστε να αφαιρεθούν οι επικαλύψεις από τις γειτονικές φθορίζουσες ουσίες.

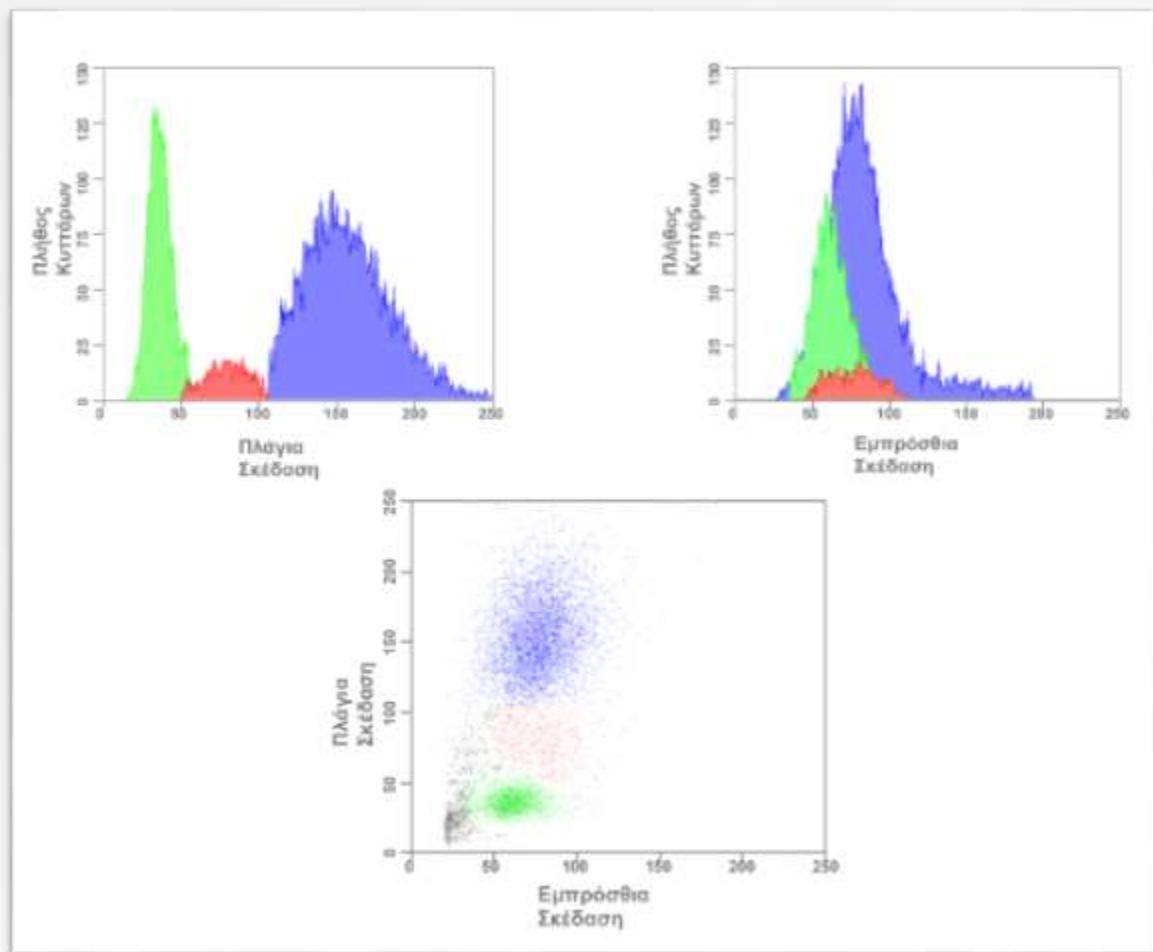




Τα βασικά υποσυστήματα ενός ΚΡ

■ Πολυπαραμετρική Ανάλυση

- Το ιστόγραμμα μίας μεταβλητής (πχ εμπρόσθια σκέδαση, ΕΣ) δεν είναι ικανό να απεικονίσει την πολυπλοκότητα των κυττάρων.
- Το ιστόγραμμα ΕΣ εμφανίζει ένα πληθυσμό κυττάρων ο οποίος εμπεριέχει, επικαλυπτόμενους, περισσότερους πληθυσμούς.
- Το ιστόγραμμα ΠΣ της ίδιας μέτρησης εμφανίζει τρεις πληθυσμούς κυττάρων.

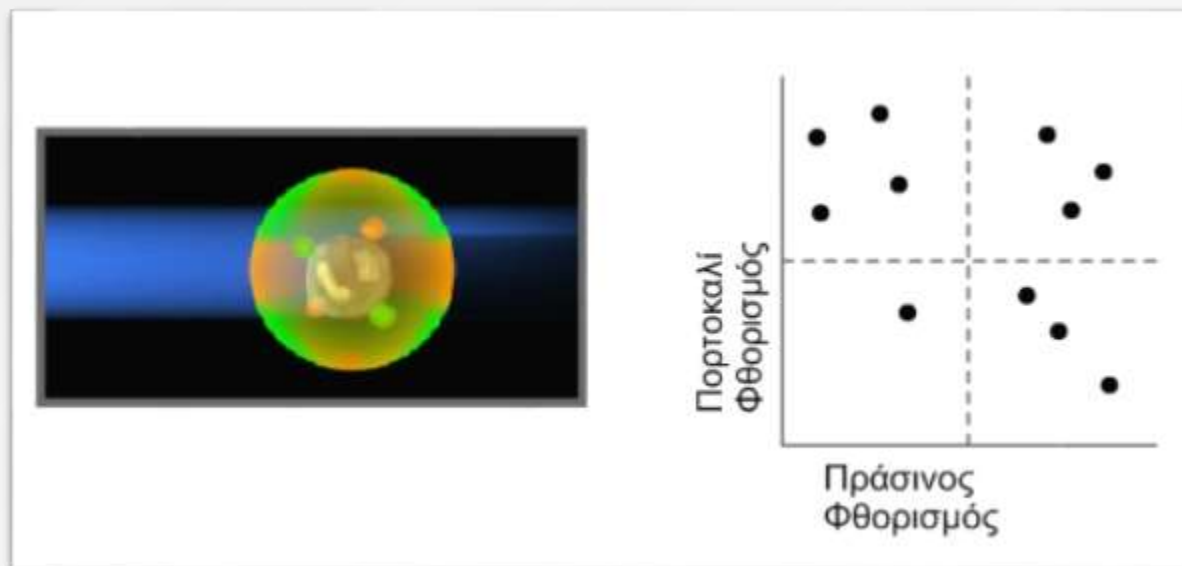


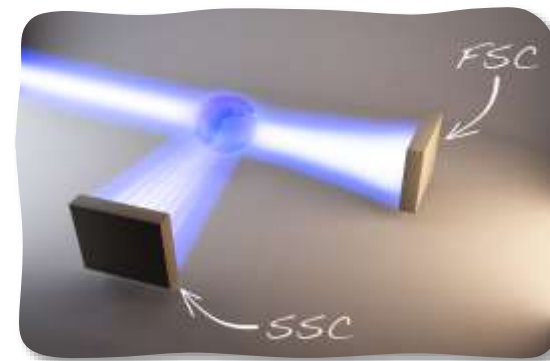
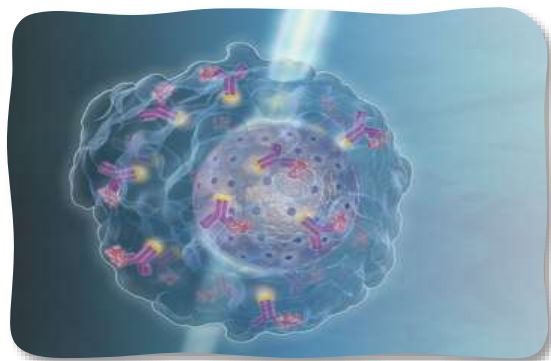
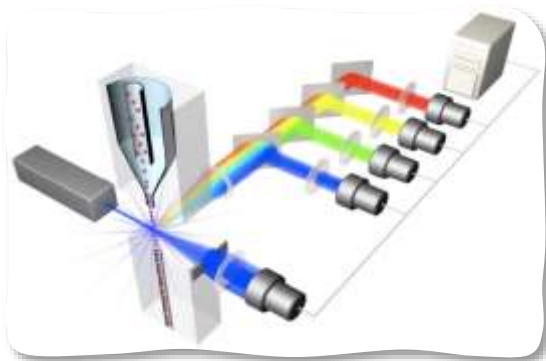


Τα βασικά υποσυστήματα ενός ΚΡ

■ Πολυπαραμετρική Ανάλυση (συνέχεια)

- Η ανάλυση των κυττάρων που έχουν συνδεθεί με δύο αντισώματα εμφανίζει 4 πληθυσμούς.
- Κύτταρα με καμία σύνδεση.
- Κύτταρα συνδεδεμένα με το αντίσωμα πράσινου φθορισμού.
- Κύτταρα συνδεδεμένα με το αντίσωμα πορτοκαλί φθορισμού.
- Κύτταρα συνδεδεμένα και με τα δύο αντισώματα.
- Η ανάλυση μίας μέτρησης στην οποία συμμετέχουν 10 χρώματα μπορεί να αναδείξει 4094 πληθυσμούς.





Ευχαριστώ για την προσοχή σας

Ιωάννης Δράκος, PhD (drakos@phd.gr)
Μηχανικός Η/Υ & Πληροφορικής