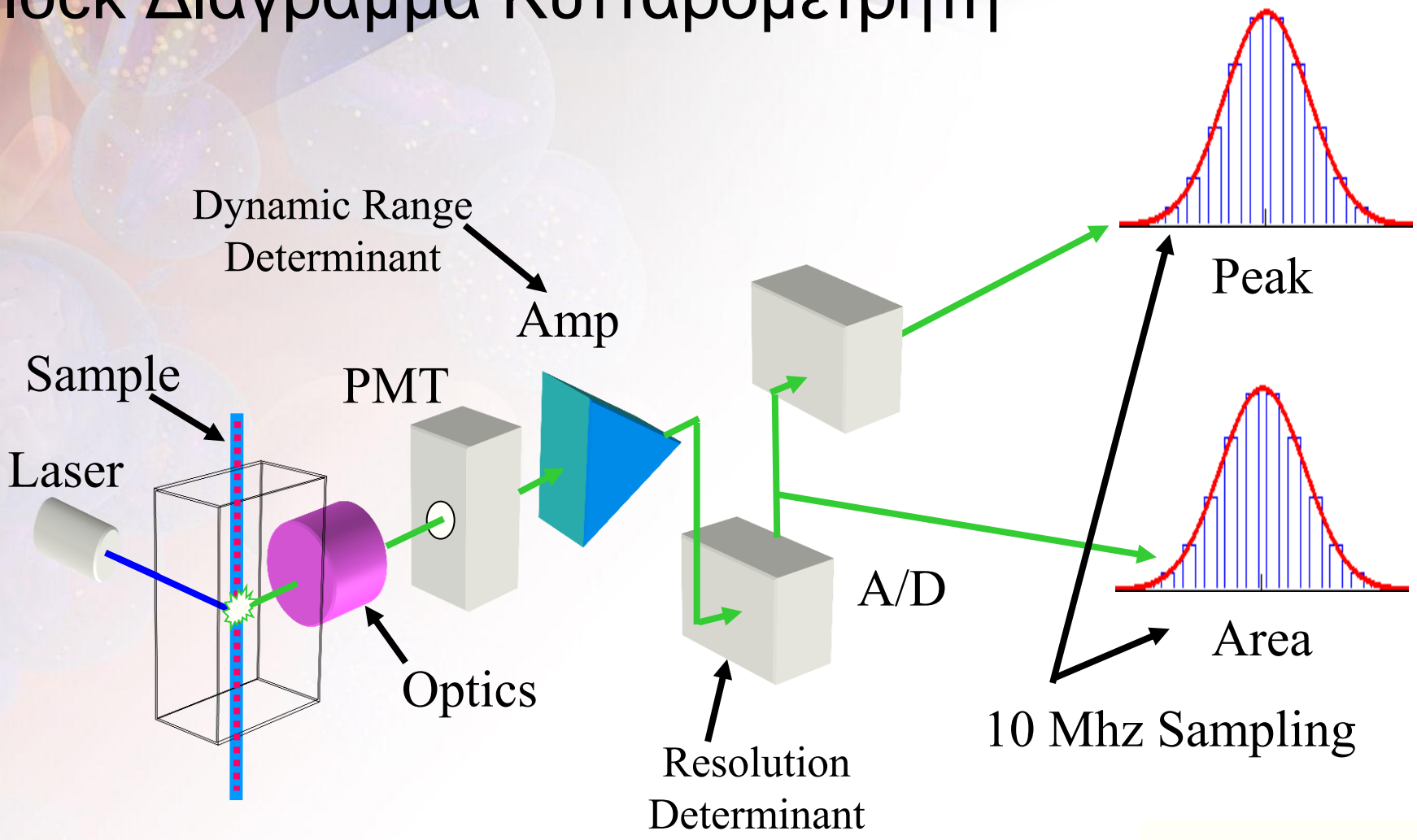
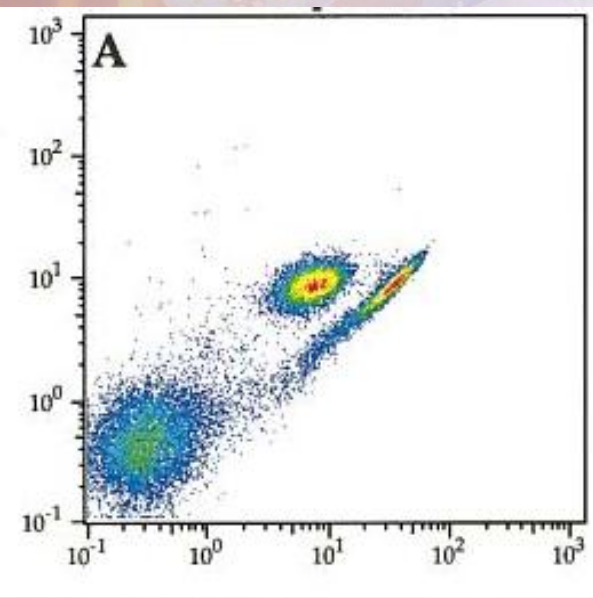
Compensation
(Αντιστάθμιση Φθορισμών)
και
Ψηφιακή Τεχνολογία

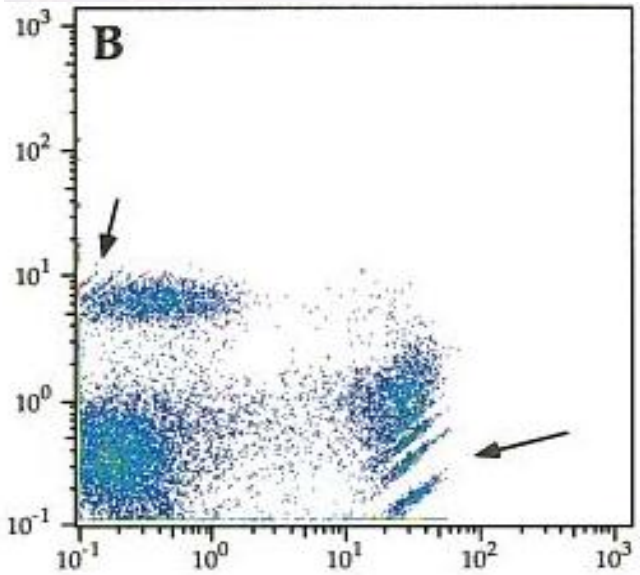
Μαρία Γεωργίου
Χημικός, PhD
Leriva Diagnostics

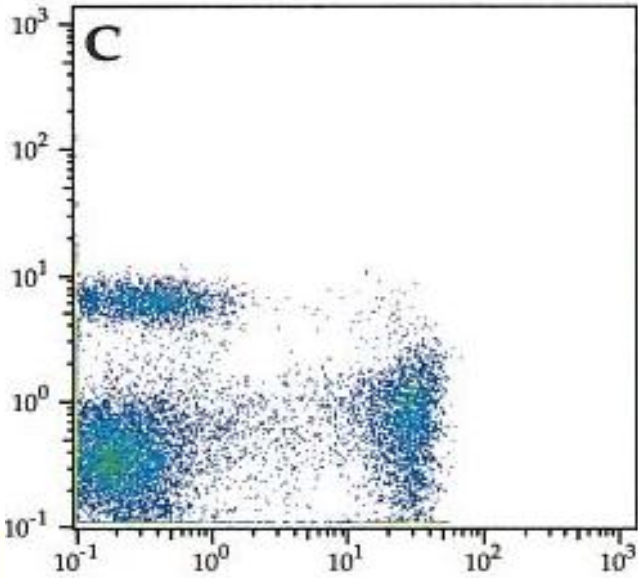
Block Διάγραμμα Κυτταρομετρητή



Αντιστάθμιση Φθορισμών (Compensation)

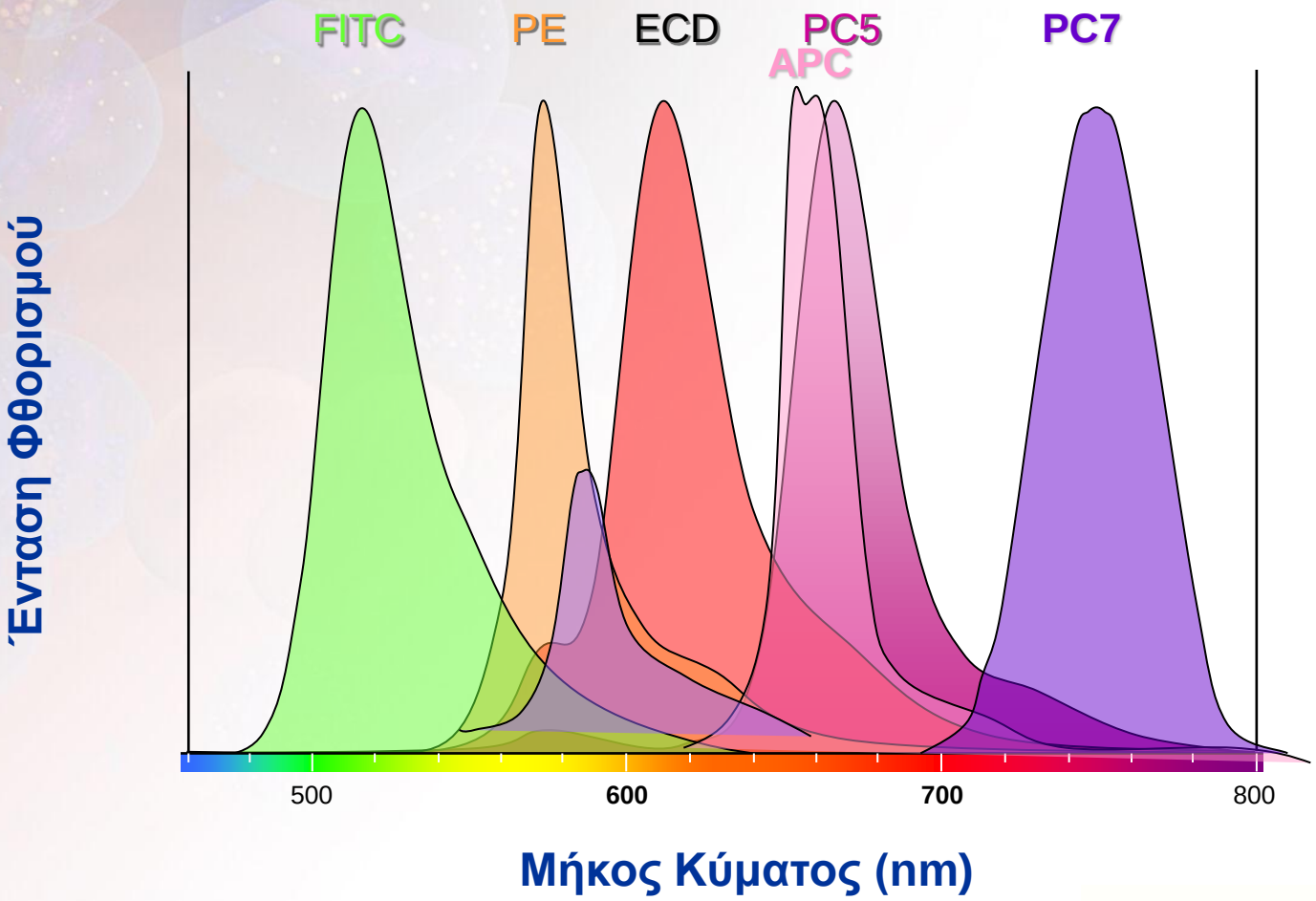




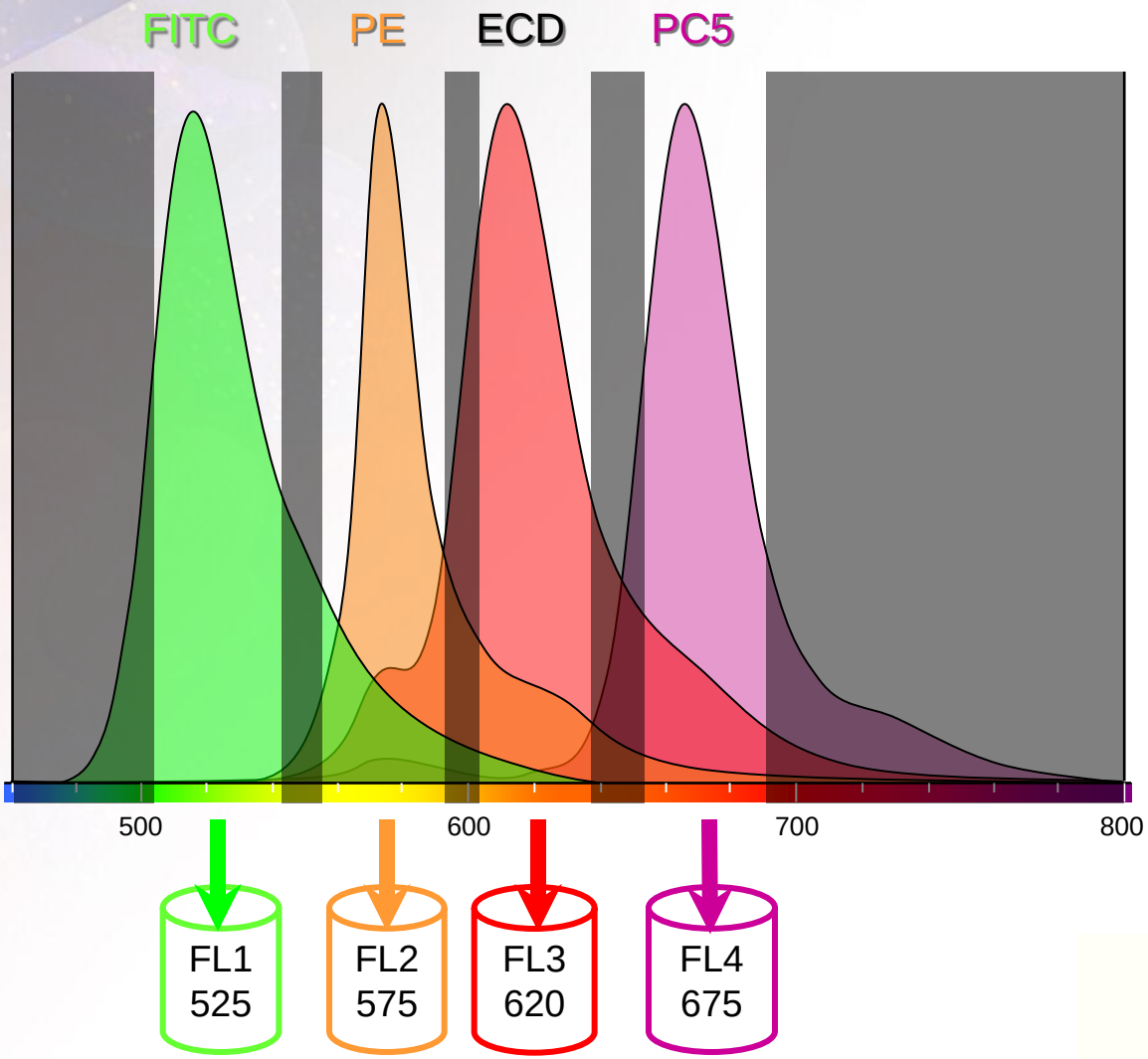


M Roederer, Spectral Compensation for Flow Cytometry: visualization Artifacts, Limitations and Caveats, Cytometry 45:194-205 (2001).

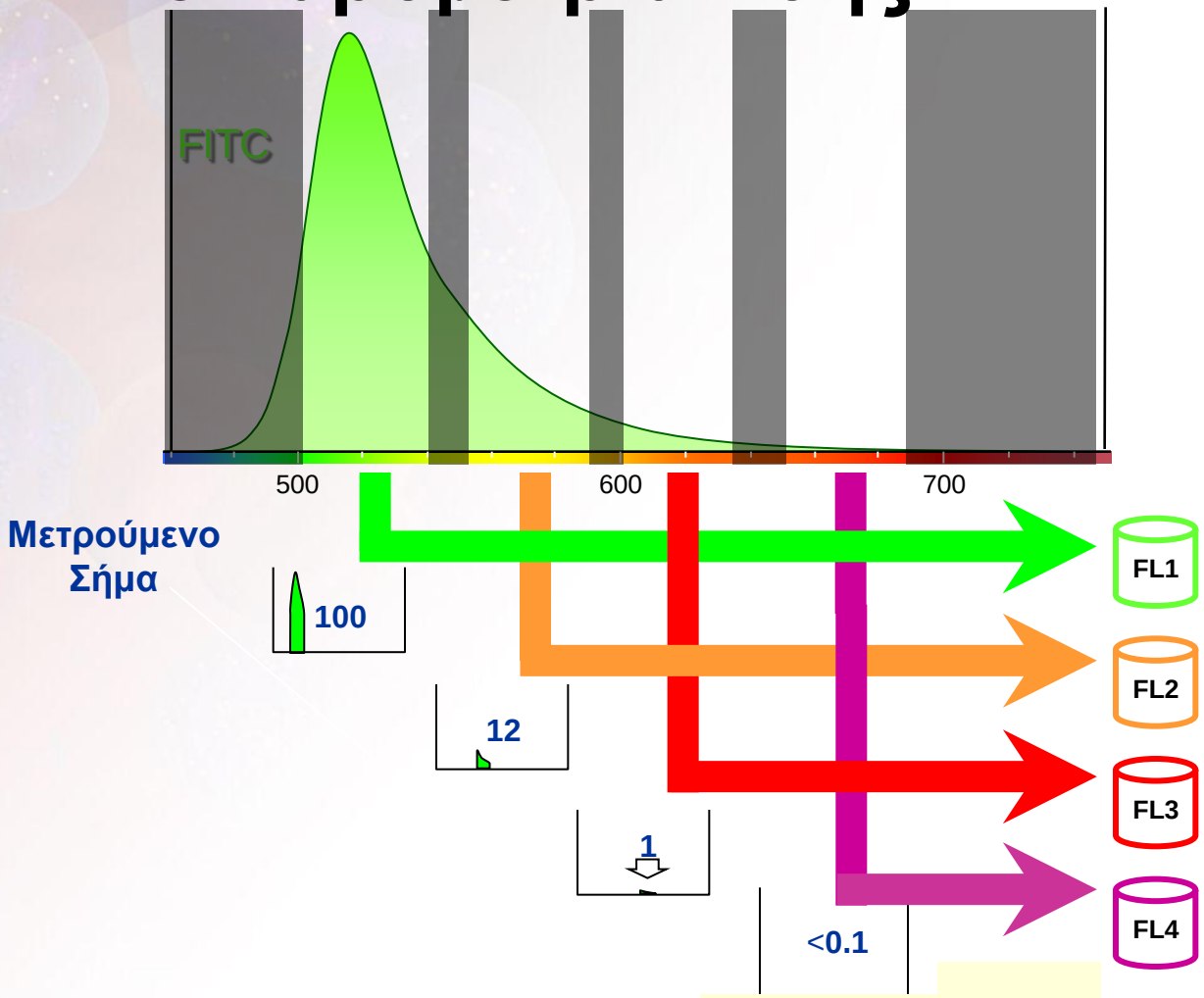
Φάσματα Εκπομπής



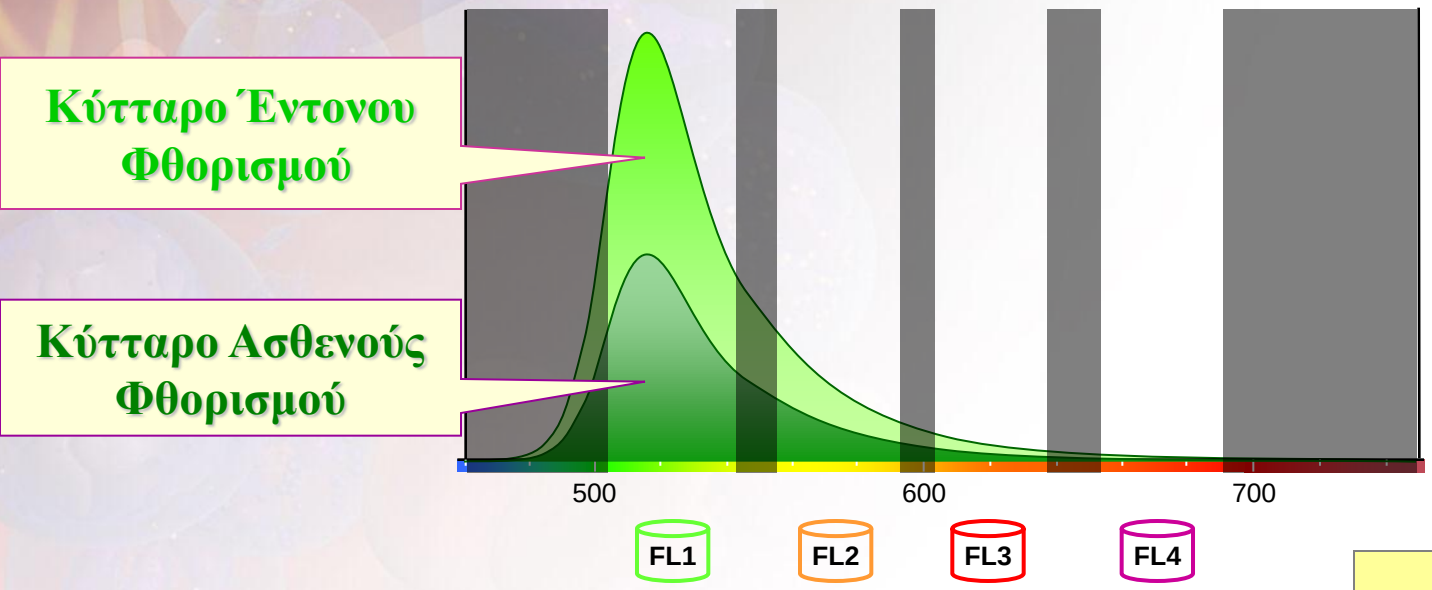
Φάσματα Εκπομπής και Ανιχνευτές



Ανίχνευση φθορισμού στην Κυτταρομετρία Ροής



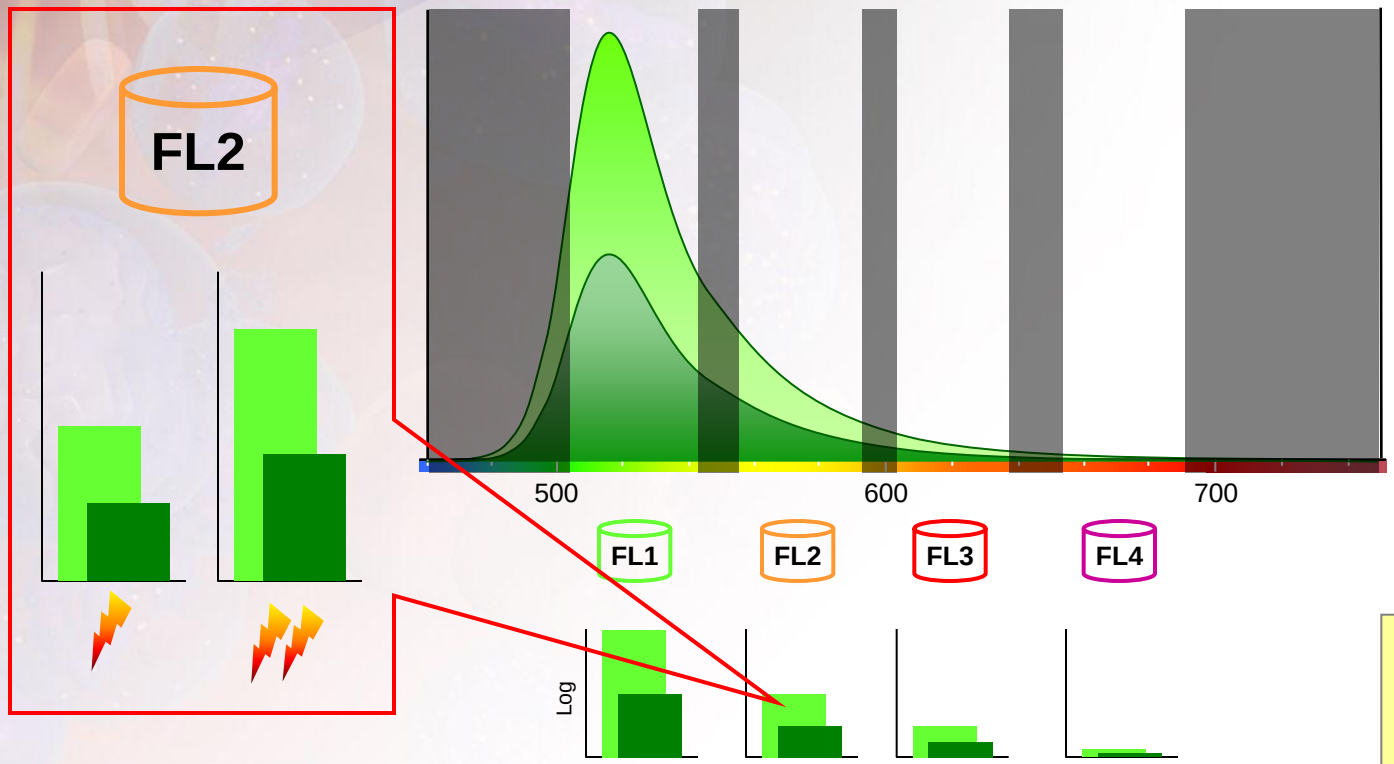
“Κανόνες” Crosstalk: 1. Σταθερή Αναλογία



	FL1	FL2	FL3	FL4
Ένταση φθορισμού	500	60	5	0.4
Λόγος Εντάσεων (%)	100	12	1	<0.1
Ένταση Φθορισμού	250	30	2.5	0.2

Ο λόγος των τιμών των εντάσεων παραμένει σταθερός, ανεξάρτητα από την ένταση φθορισμών

“Κανόνες” Crosstalk : 2. Εξάρτηση από τις ρυθμίσεις των PMTs

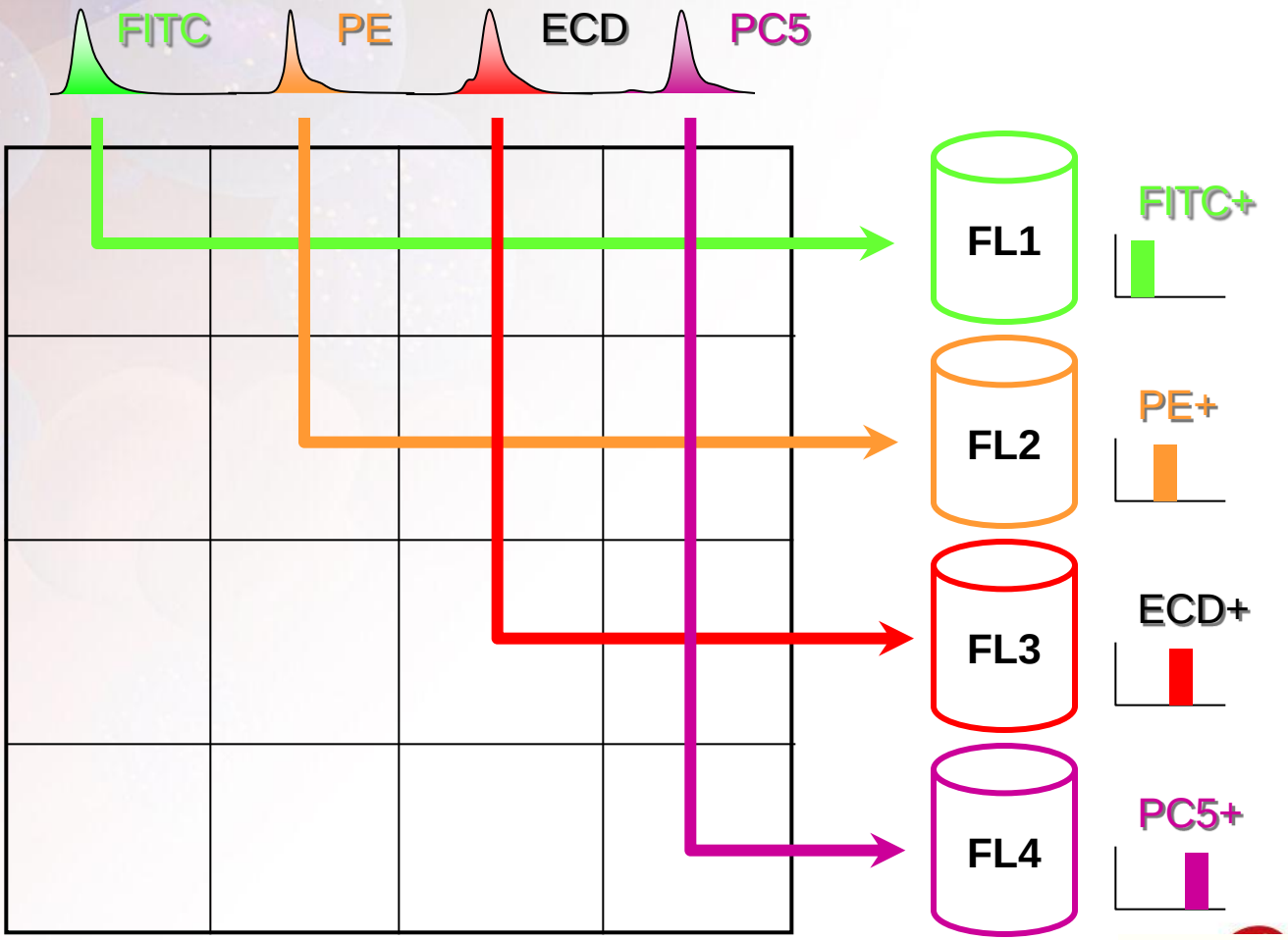


Ένταση Φθορισμού	500	~~60~~ 120	5	0.4
Λόγος Εντάσεων (%)	100	~~12~~ 24	1	<0.1
Ένταση Φθορισμού	250	~~30~~ 60	2.5	0.2

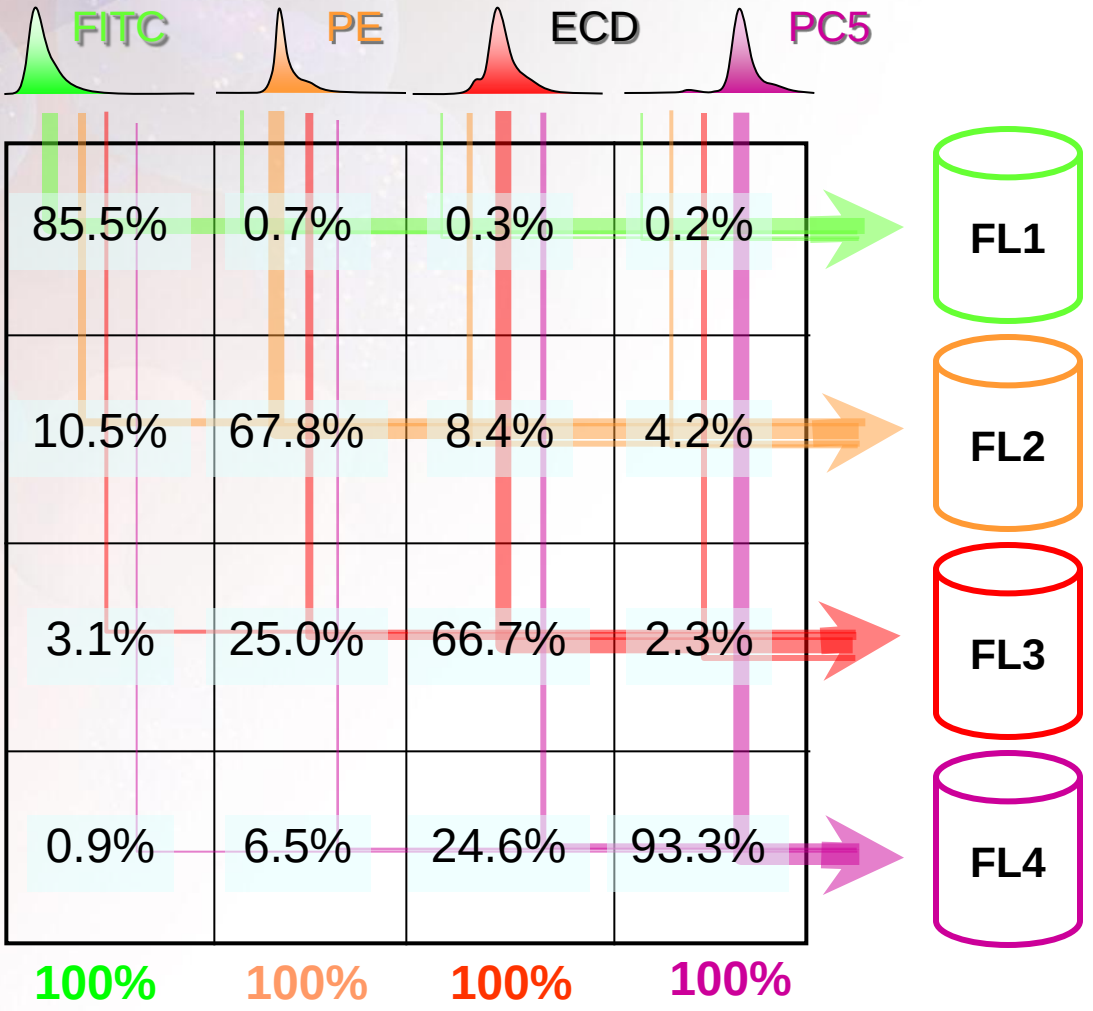
Αλλαγή της τάσης (Volts) σε ένα PMT συνεπάγεται και αλλαγή στο λόγο των εντάσεων φθορισμού και προς τους άλλους PMTs

Τι Θέλουμε ;

Το σήμα σε κάθε PMT **να προέρχεται από ένα και μόνο φθοριόχρωμα**

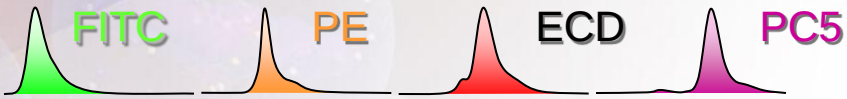


Πίνακας Crosstalk (Μετρηθέν)

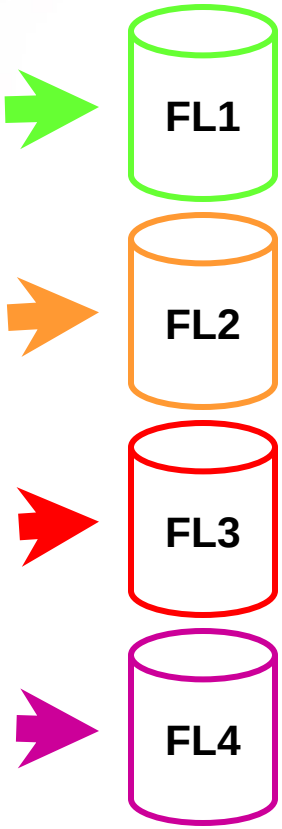


Πίνακας Crosstalk

(Κανονικοποιημένος)

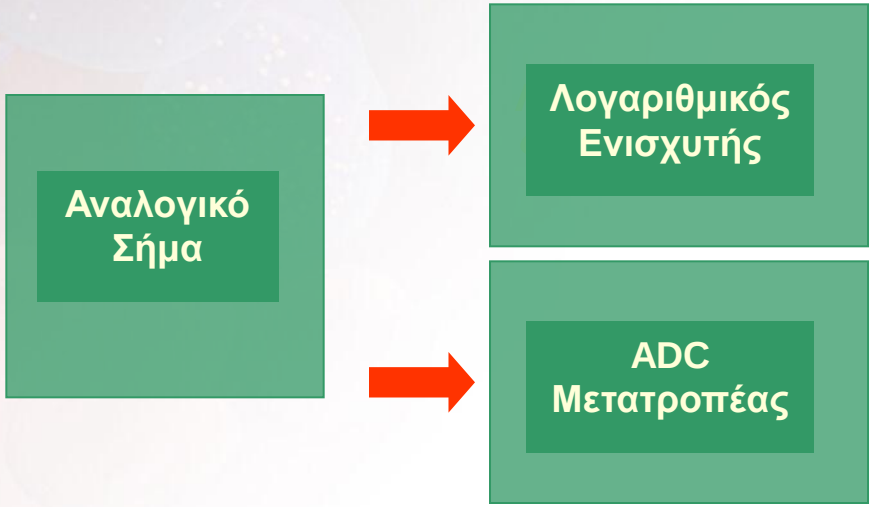


100%	1.1%	0.4%	0.2%
12.3%	100%	12.7%	4.5%
3.6%	36.8%	100%	2.4%
1.0%	9.5%	36.9%	100%

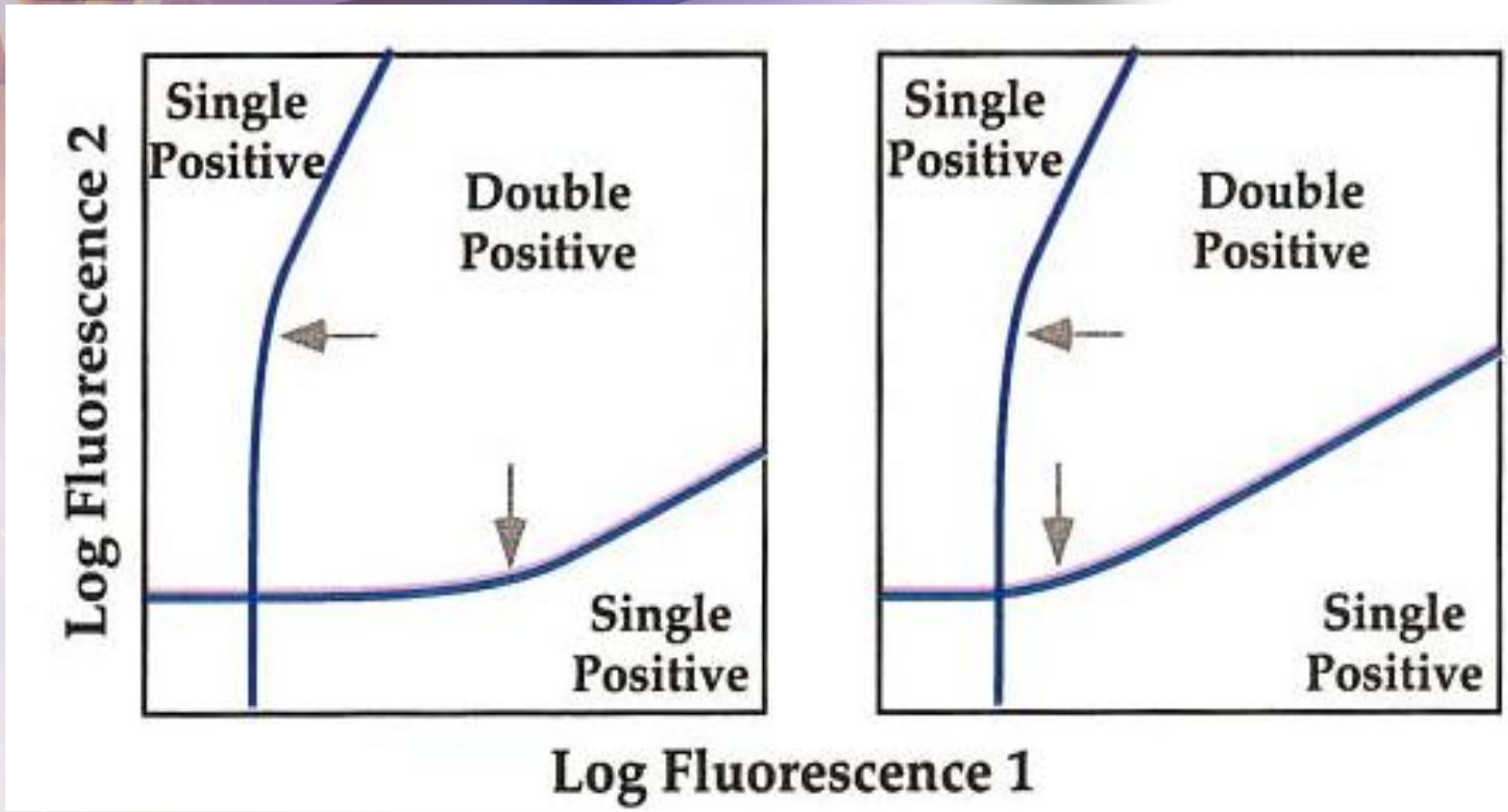


Αντιστάθμιση Φθορισμών

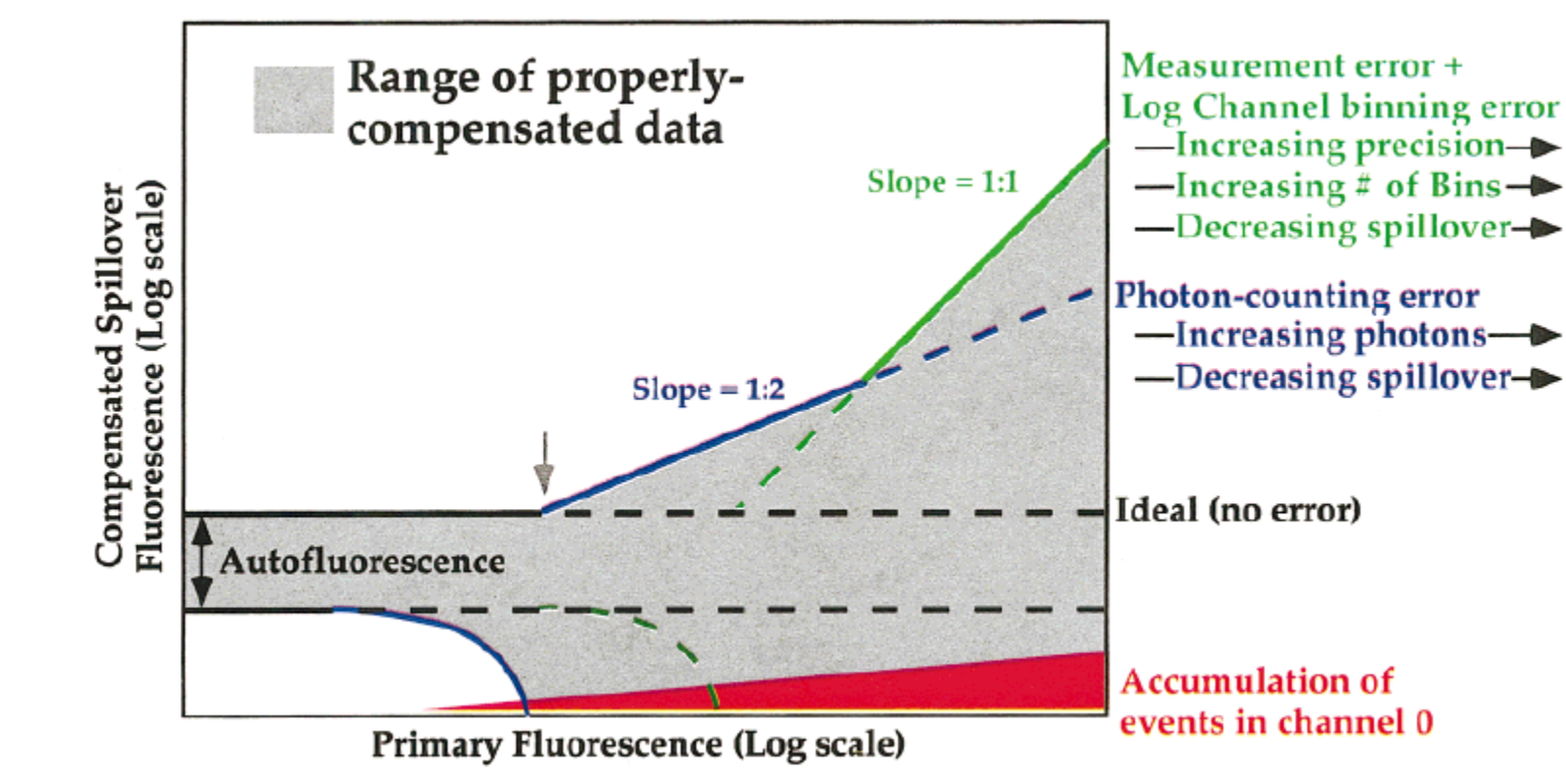
Α. Μέσω μηχανήματος *(Instrument Compensation)*



Β. Μέσω Λογισμικού *(Software Compensation)*



M Roederer, Spectral Compensation for Flow Cytometry: visualization Artifacts, Limitations and Caveats, Cytometry 45:194-205 (2001).



- M Roederer, Spectral Compensation for Flow Cytometry: visualization Artifacts, Limitations and Caveats, Cytometry 45:194-205 (2001).

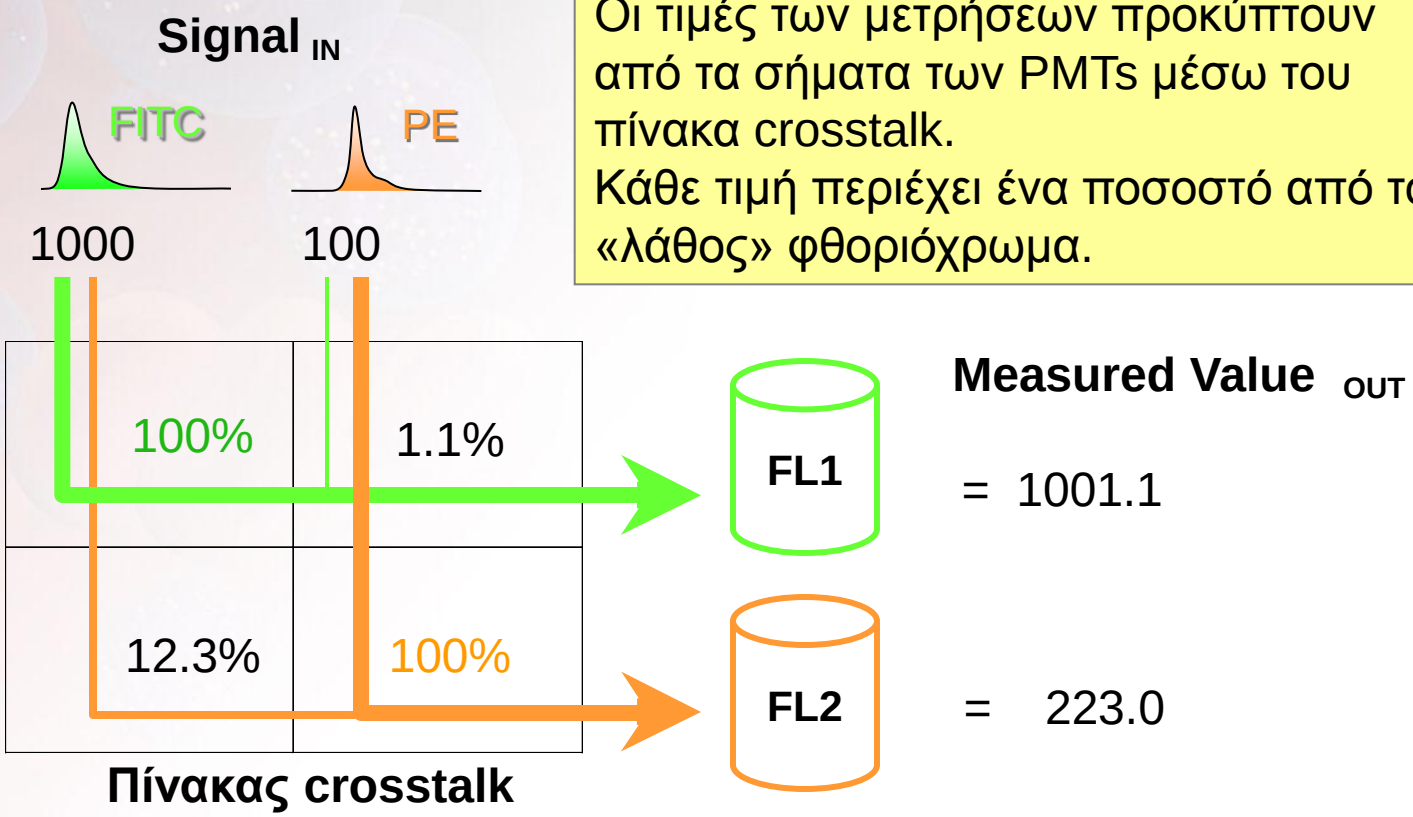
Αντιστάθμιση Φθοριοχρωμάτων

Παράγοντες που επηρεάζουν :

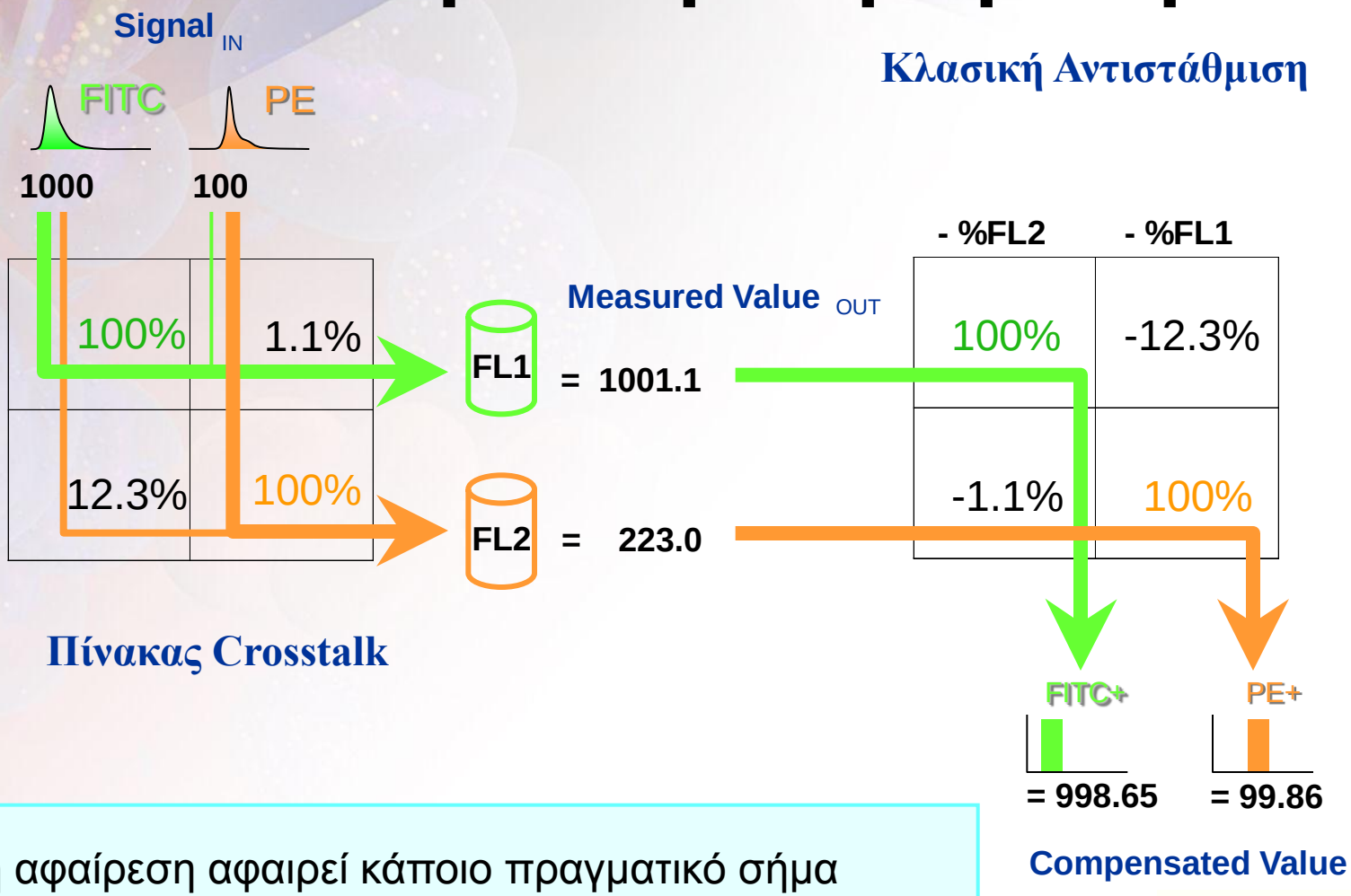
- φασματική επικάλυψη (spill over detector)
- σφάλματα κατά τη μετατροπή των σημάτων σε ψηφιακά (binning effects 18bit)
- σφάλματα κατά τη μέτρηση των φωτονίων (photon counting statistics)
- φως στον ενισχυτή

Κλασική Αντιστάθμιση : *Το πρόβλημα*

Οι τιμές των μετρήσεων προκύπτουν από τα σήματα των PMTs μέσω του πίνακα crosstalk.
Κάθε τιμή περιέχει ένα ποσοστό από το «λάθος» φθοριόχρωμα.

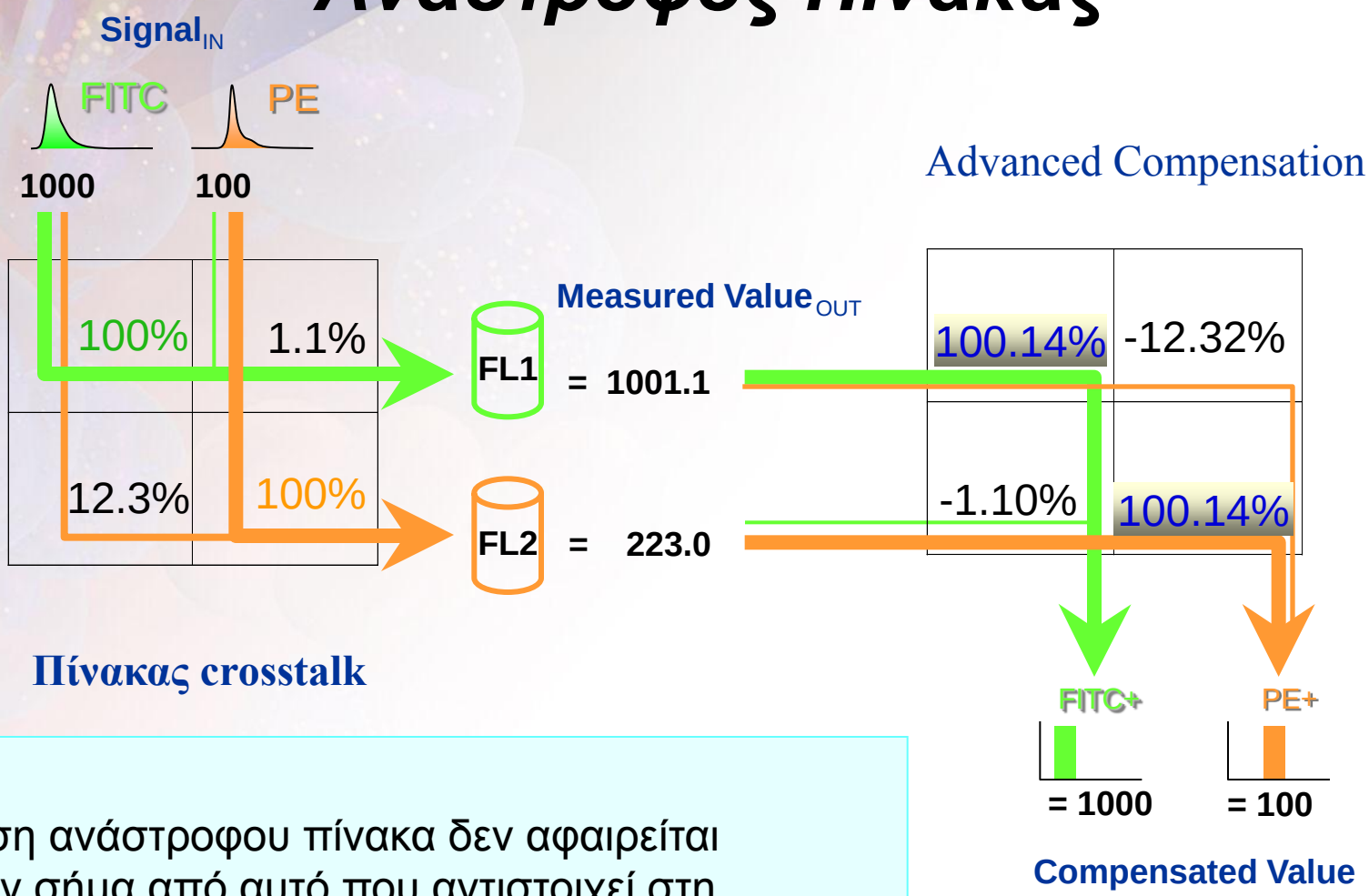


Η Απλή Λύση : Αφαίρεση



Η απλή αφαίρεση αφαιρεί κάποιο πραγματικό σήμα επιπλέον αυτού που αντιστοιχεί στη φασματική επικάλυψη

Η πλέον ενδεικνυόμενη Λύση : *Ανάστροφος Πίνακας*



Πίνακας crosstalk

Με χρήση ανάστροφου πίνακα δεν αφαιρείται επιπλέον σήμα από αυτό που αντιστοιχεί στη φασματική επικάλυψη (overcompensation)

Ψηφιοποίηση Σήματος

Ψηφιοποίηση Σήματος

Digital Signal Processing

Τι είναι η ψηφιοποίηση σήματος?

Μετατροπή αναλογικού σήματος (volts) σε ψηφιακό (numbers) με χρήση Αναλογοψηφιακού Μετατροπέα (ADC): το ψηφιακό σήμα επεξεργάζεται περαιτέρω (compensation, ratio…)

Γιατί είναι απαραίτητη?

Για αποφυγή σφαλμάτων που οφείλονται στους λογαριθμικούς ενισχυτές και στην αντιστάθμιση φθορισμών μέσω hardware.

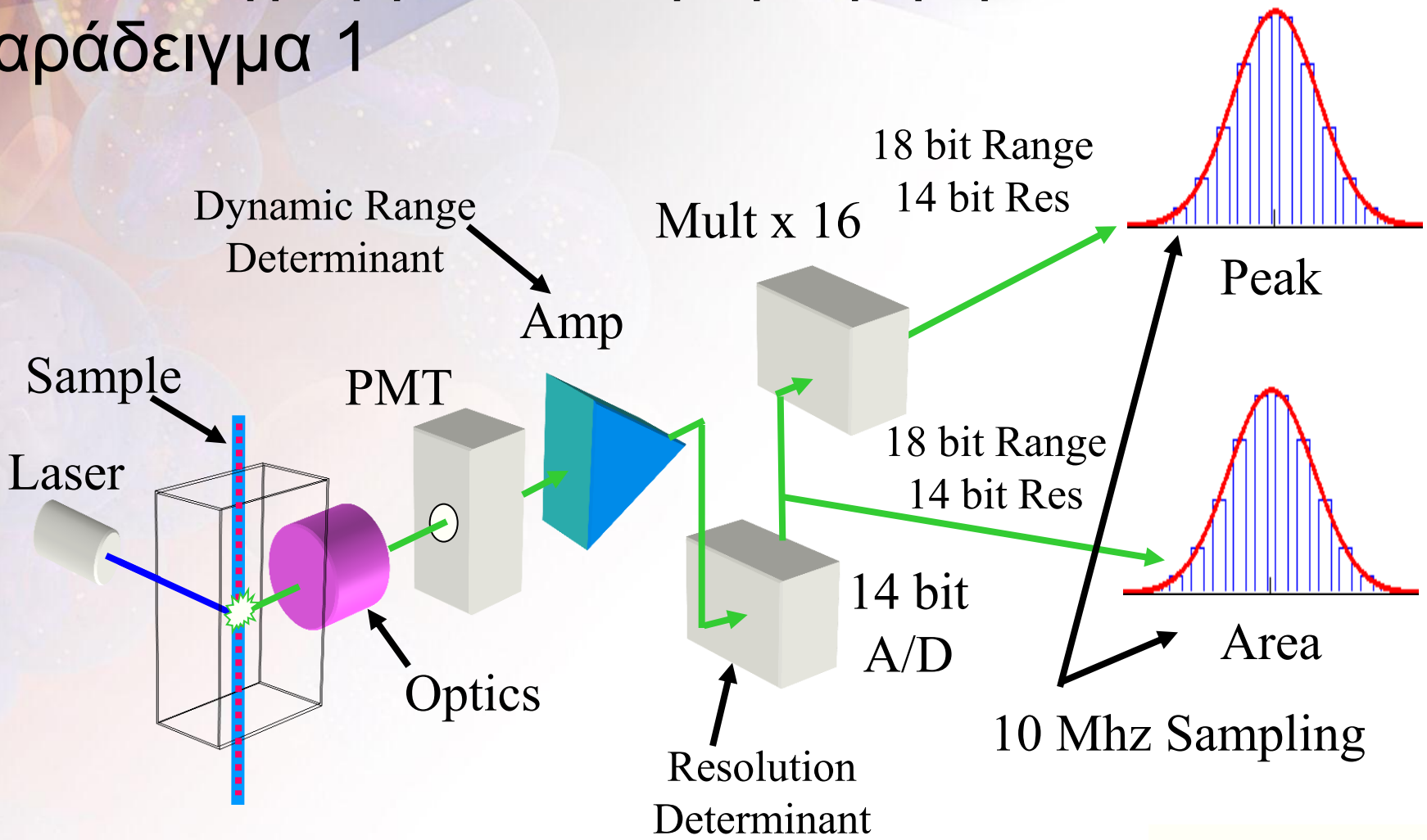
Πότε γίνεται?

Νωρίτερα – αμέσως μετά το PMT – πιο ακριβή λύση, θυσιάζουμε ακρίβεια σε σύγχρονη τεχνολογία

Λίγο αργότερα – συλλογή αναλογικών σημάτων με γραμμικά κυκλώματα, ακολουθεί ψηφιοποίηση – λιγότερο κόστος , καλύτερη ακρίβεια

Ανάγκη Λογαριθμικών σημάτων γιατί στα βιολογικά δείγματα τα σήματα >3log δεκάδων

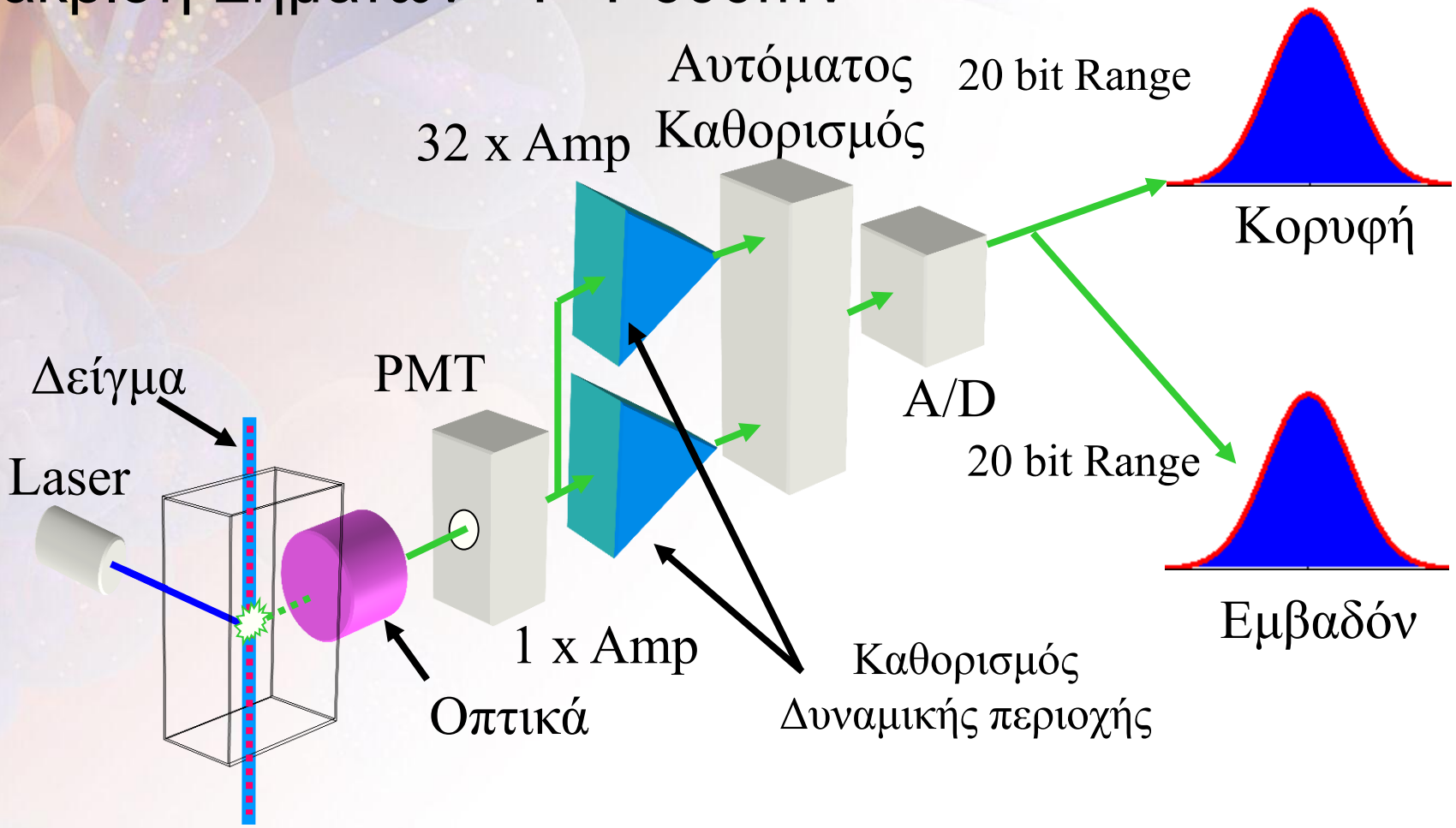
Block Διάγραμμα Κυτταρομετρητή Παράδειγμα 1



Παράδειγμα 2

Τεχνολογία Beckman Coulter

Διάκριση Σημάτων >?<? 600mV

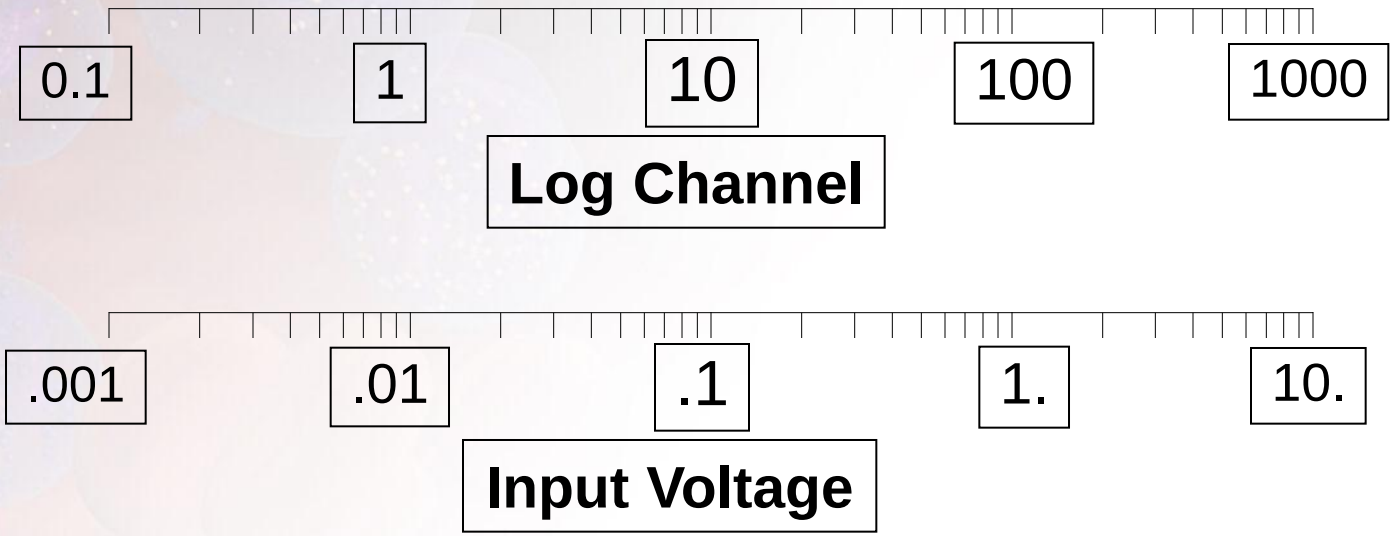


Δεδομένα στη συλλογή σήματος

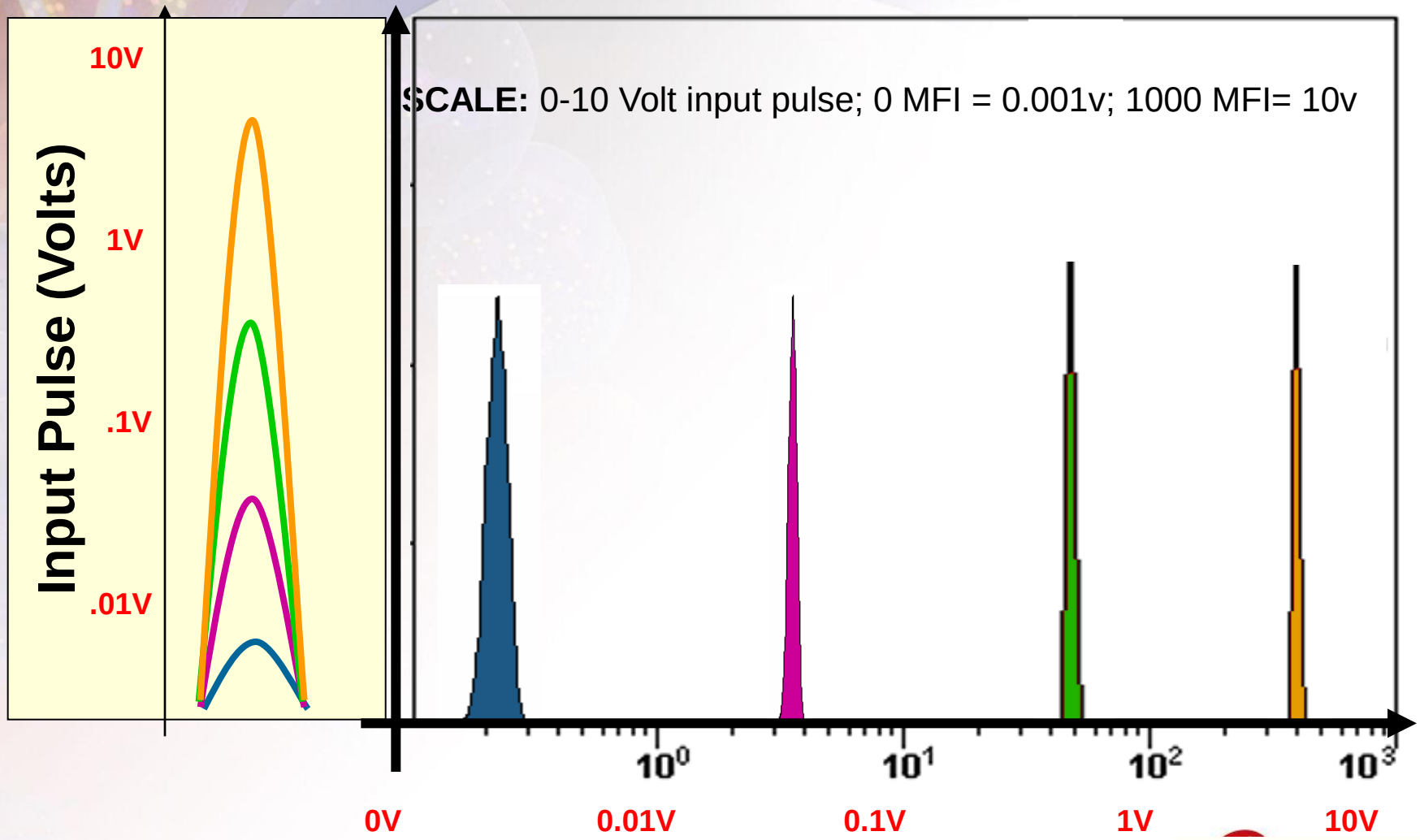
1. Αναλογικό Σήμα 0 – 10 volt (FL φθορισμός).
2. Σε log κλίμακα 10 volt=max, 1 volt είναι στην κορυφή της 3ης δεκάδας (δηλ. μόνο στο 10% του μέγιστου σήματος).
3. Θόρυβος 1mV, = 0.001V [2]
4. Ο θόρυβος επηρεάζει περισσότερο τα σήματα της 1ης log δεκάδας.

[2] Shapiro, H. Practical Flow Cytometry, 4th Ed. Page 219.
RMS = Root Mean Square or electronic, inherent noise

Input Voltage to Log Channel Relationship



Σχέση αναλογικού σήματος με Λογαριθμικό

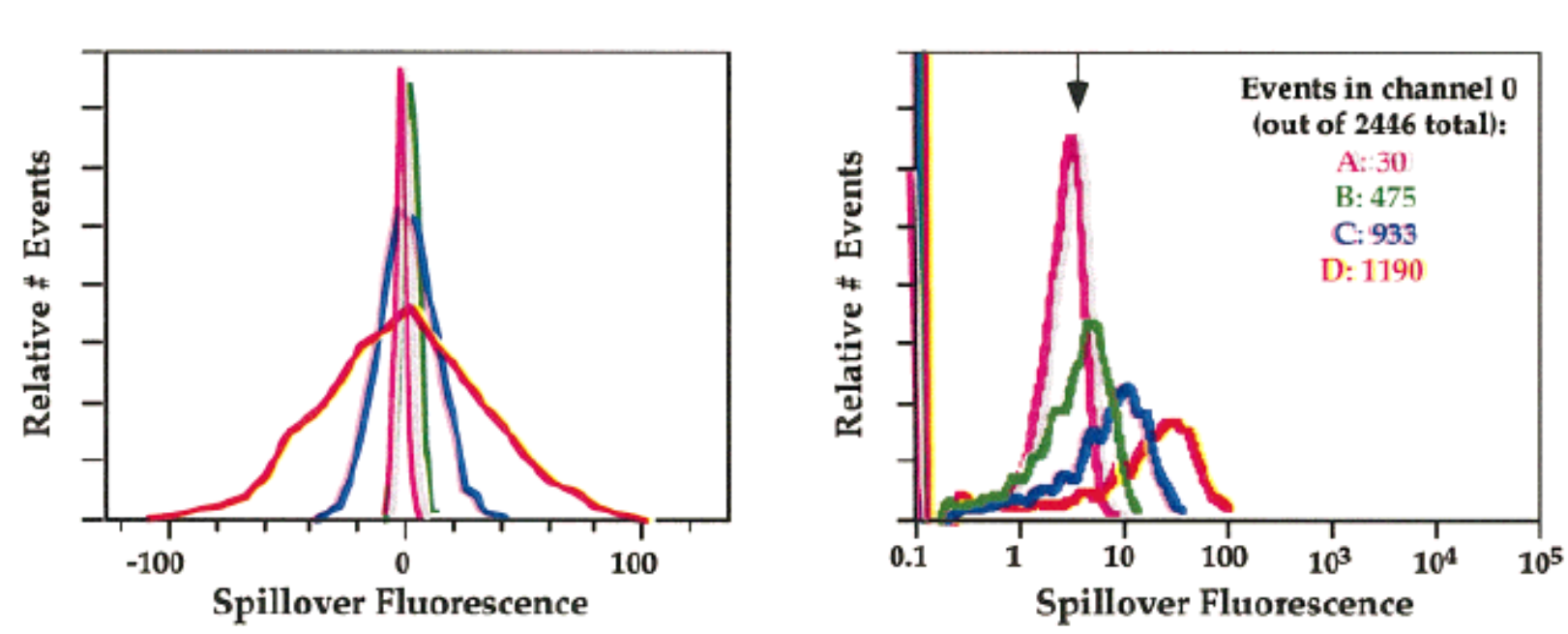


Τι θέλουμε από τα δεδομένα?

- What we care about is getting accurate integral values representative of the amounts of fluorescence measured from each cell in each spectral region.[1]

  - **** mean / median channel info***

[1] Shapiro, H. Practical Flow Cytometry, 4th Ed. Page 213.



M Roederer, Spectral Compensation for Flow Cytometry: visualization Artifacts, Limitations and Caveats, Cytometry 45:194-205 (2001).

Μετατροπή Αναλογικού Σήματος σε Ψηφιακό

Number of Bits	# of Channels	Voltage / LSB*
8	256	39.1 mV
10	1,024	9.77 mV
12	4,096	2.44 mV
14	16,384	610 μV
16	65,536	153 μV
18	262,144	38.1 μV
20	1,048,576	9.54 μV
22	4,194,304	2.38 μV
24	16,777,216	596 nV

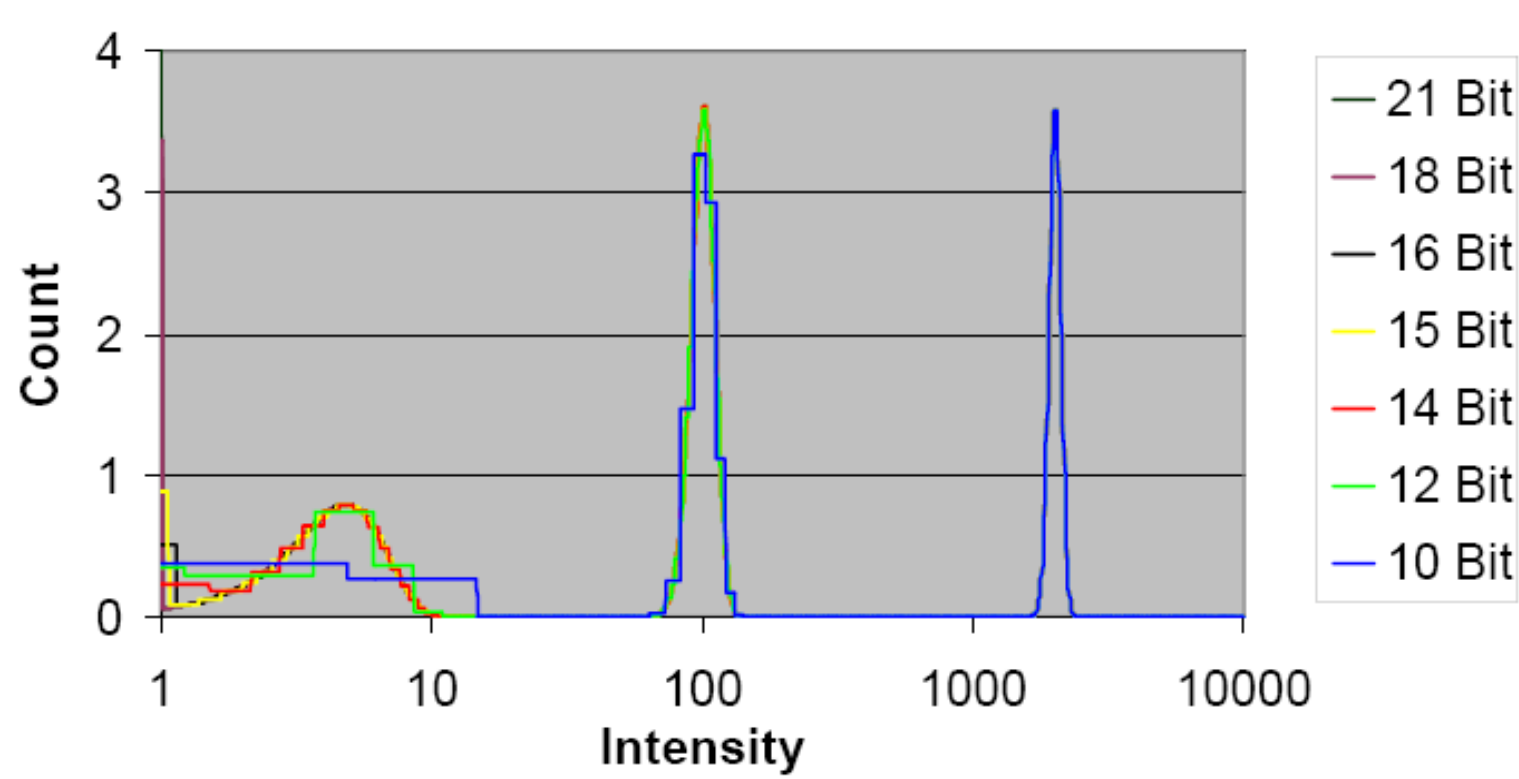
.

Λιγότερα bits, λιγότερα κανάλια διαθέσιμα, δυσκολότερα ανιχνεύονται μικρές αλλαγές στην ένταση του φθορισμού [3].

[3] Shapiro, H. Practical Flow Cytometry, 4th Ed. Page 206.

*LSB = least significant bit, voltage difference between channel n and channel n+1.

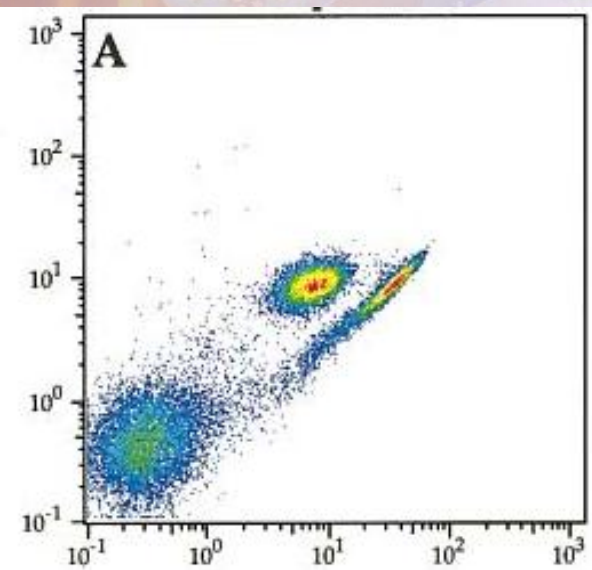
Σύγκριση Σημάτων με βάση την Ανάλυση (Resolution)

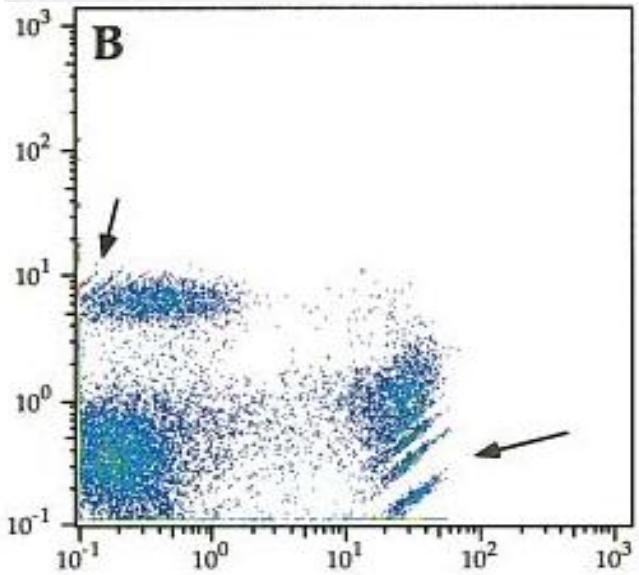


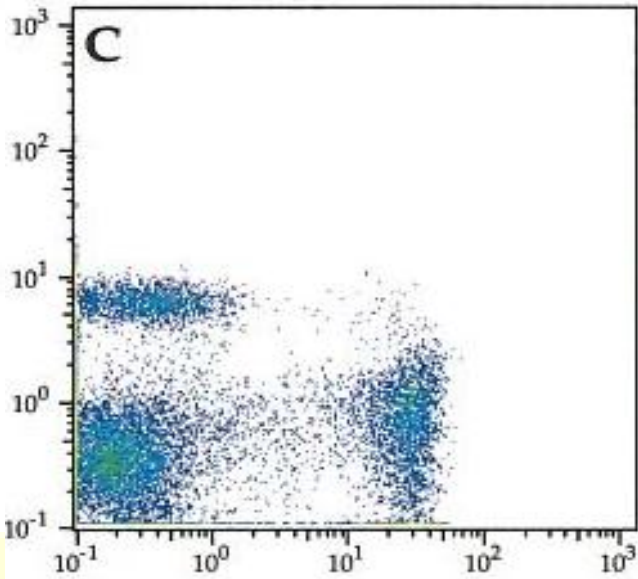
Στην 1η log δεκάδα υπάρχουν λιγότερα κανάλια για τη χρήση στην παρουσίαση των σημάτων

Courtesy Dr. James Wood, Lake Forest University

Αντιστάθμιση Φθορισμών (Compensation)







M Roederer, Spectral Compensation for Flow Cytometry: visualization Artifacts, Limitations and Caveats, Cytometry 45:194-205 (2001).

“Picket fence”, συνδυασμός γραμμικής και λογαριθμικής κλίμακας

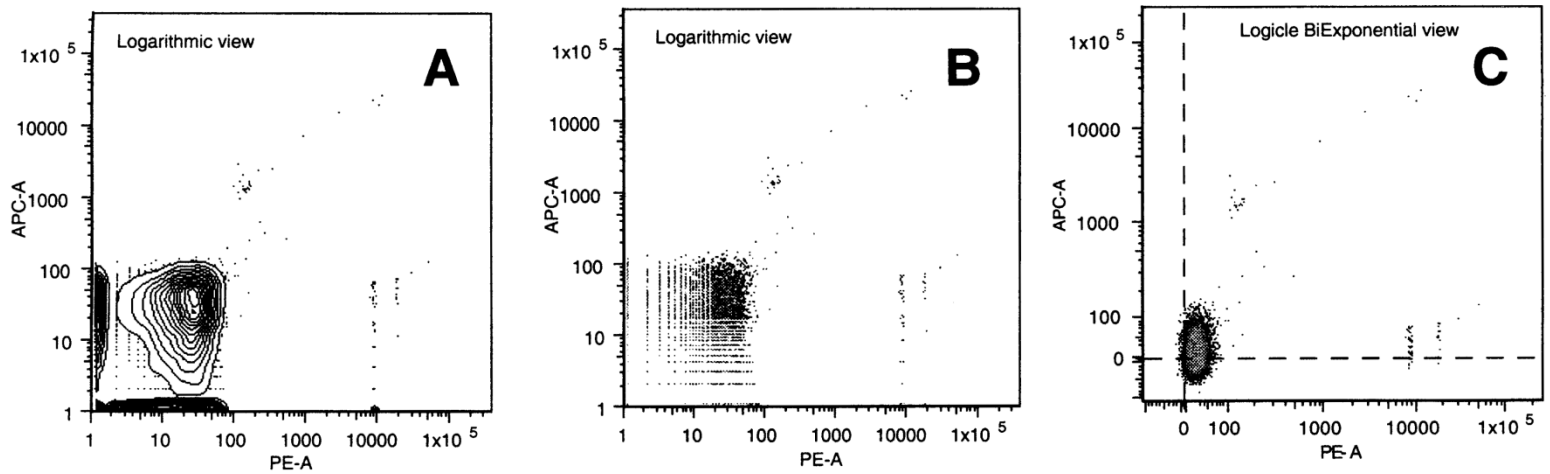
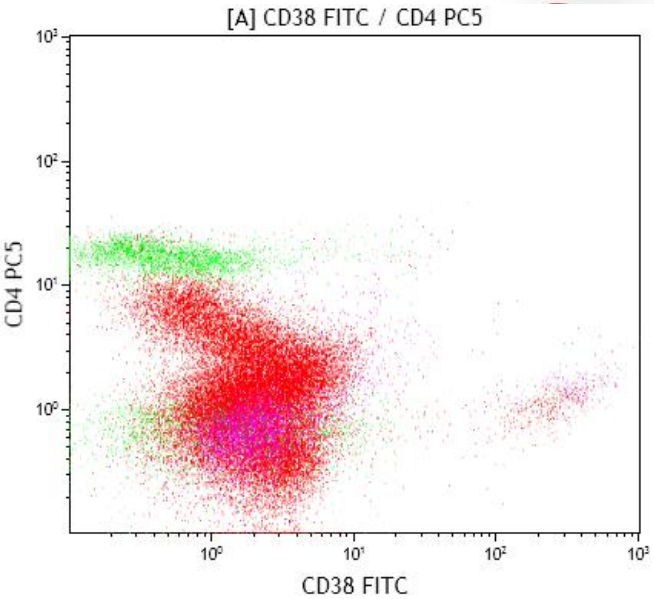
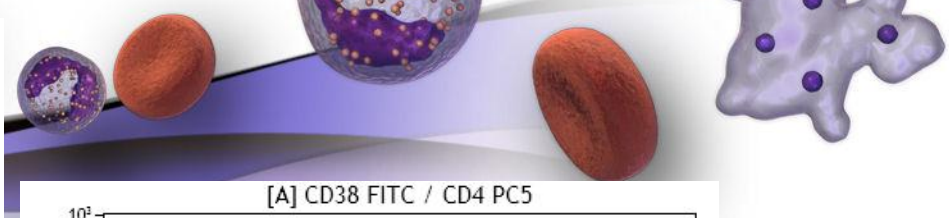
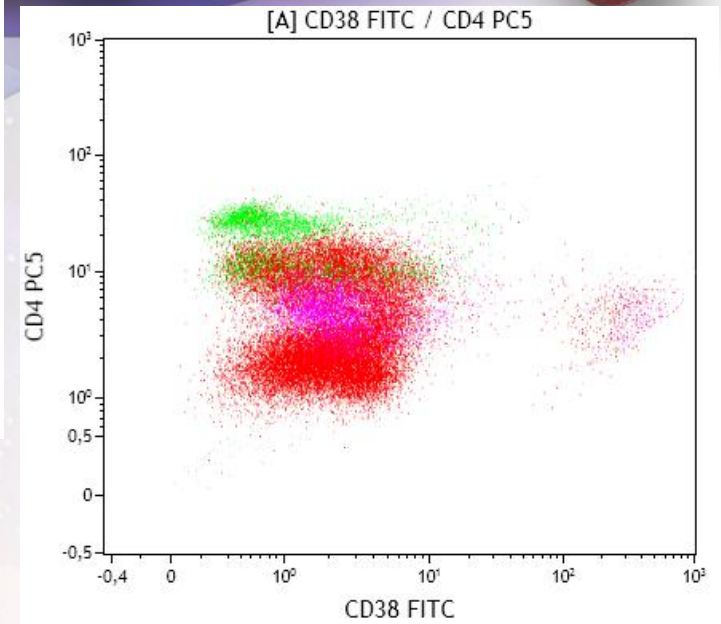


Figure 12-1. Tearing down the “picket fence” and reuniting the negatives using a BiExponential data transform instead of a logarithmic scale. Courtesy of David Parks and Wayne Moore (Herzenberg Lab, Stanford).

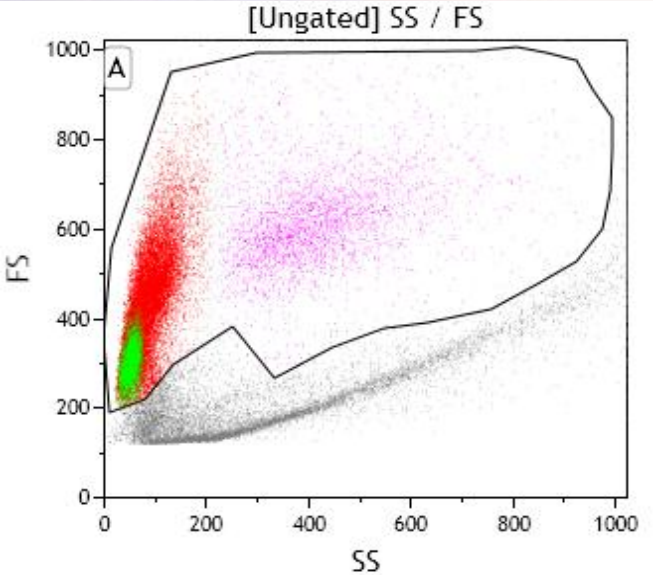
Shapiro, H. Practical Flow Cytometry, 4th Ed. Page 562

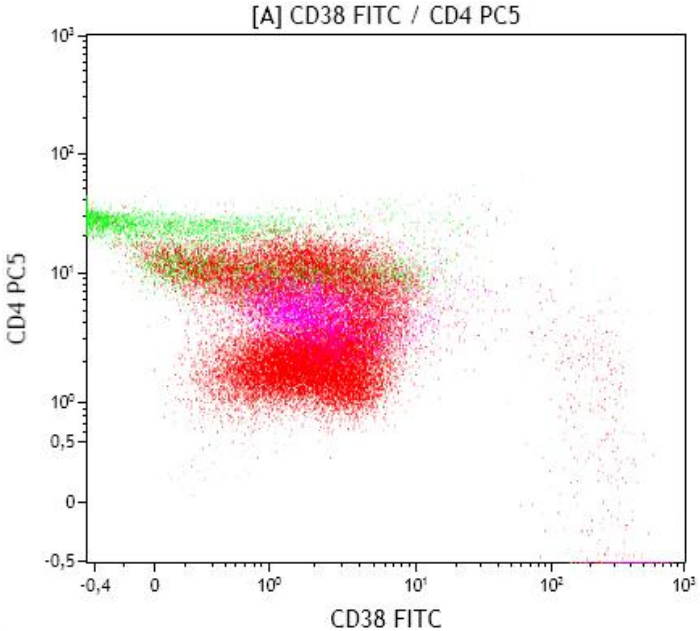




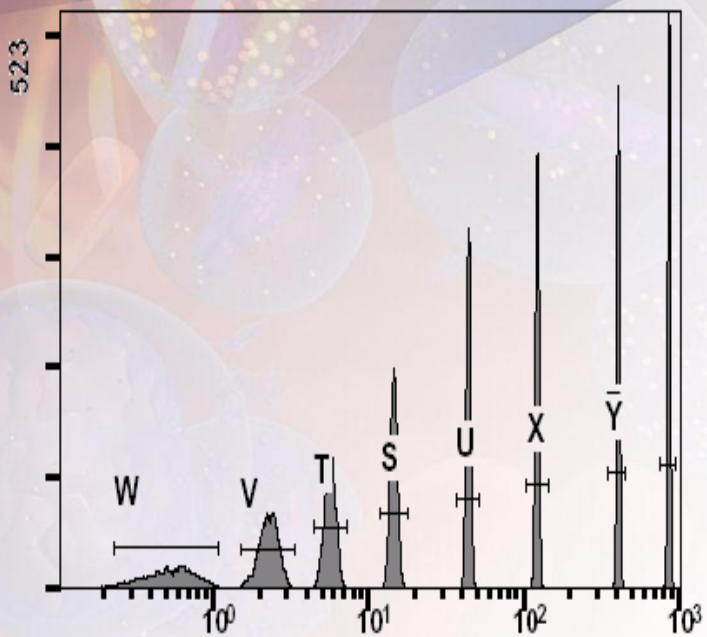


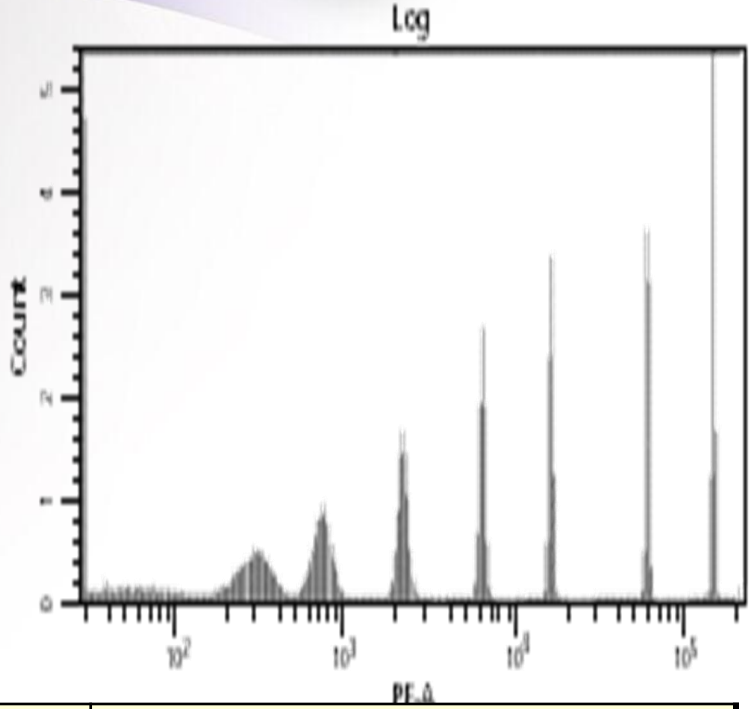
Συνδυασμός
Γραμμικής και
Λογαριθμικής
Κλίμακας
Kaluza soft BC





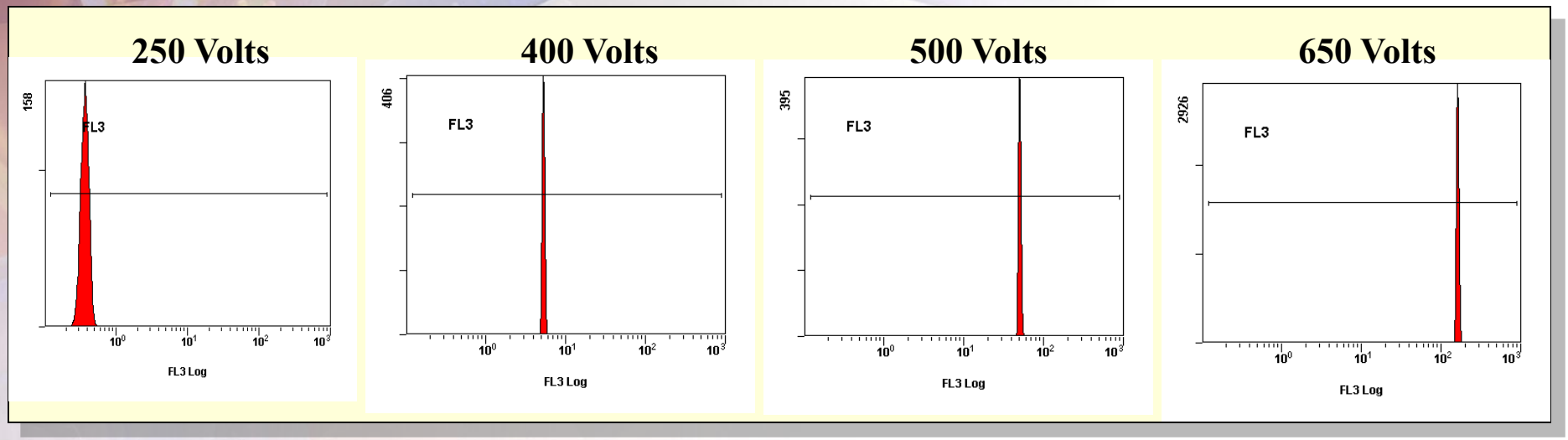
Log Histogram Display

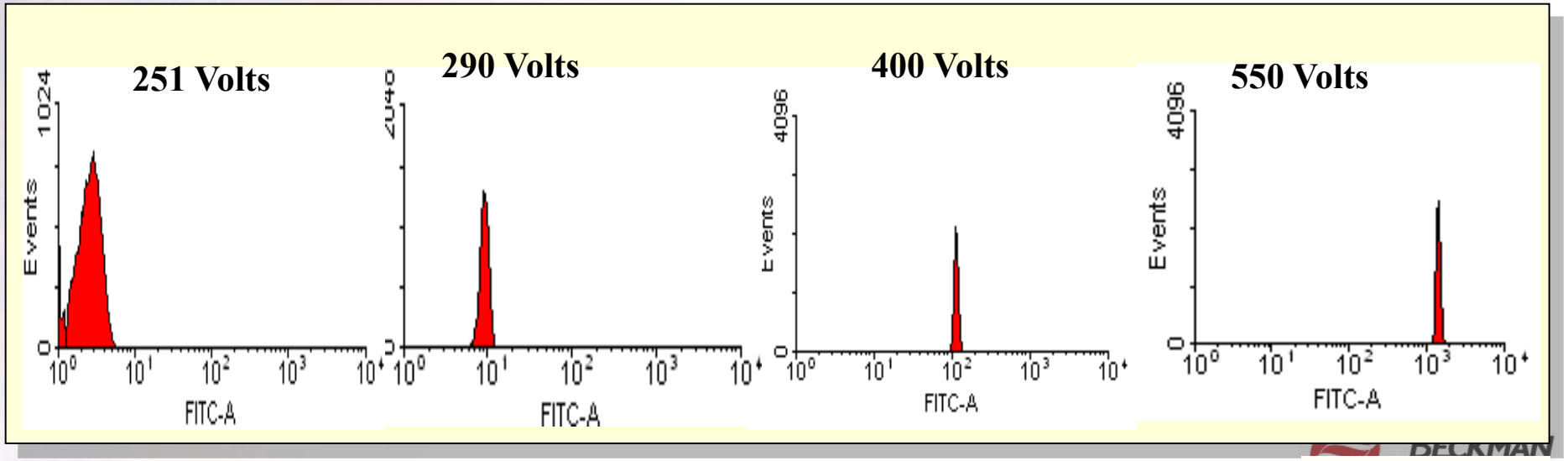




Resolution	20-bit	14-bit
% Σφάλμα	<1.5% 1η δεκάδα <1% 2-4η δεκάδα	<50% 1η δεκάδα <7.5% 2η δεκάδα <1.0% 3-4η δεκάδα
Δυναμική Περιοχή	4 δεκάδες	~2 δεκάδες

(20-bit) vs (14-bit): Δεδομένα 4 log δεκάδων



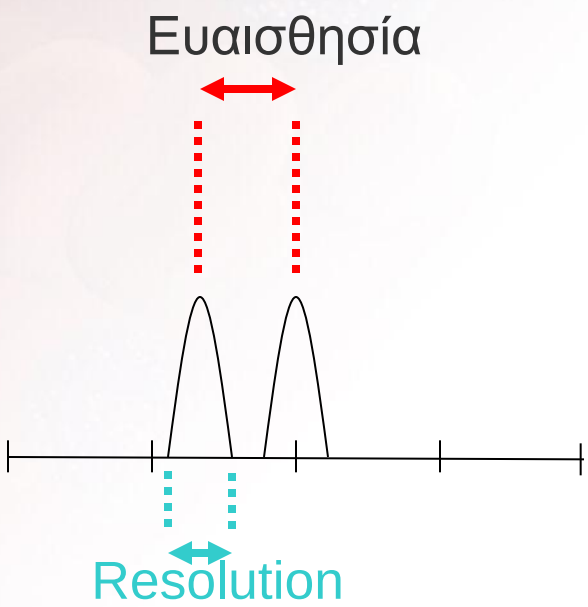


Flow Set Beads

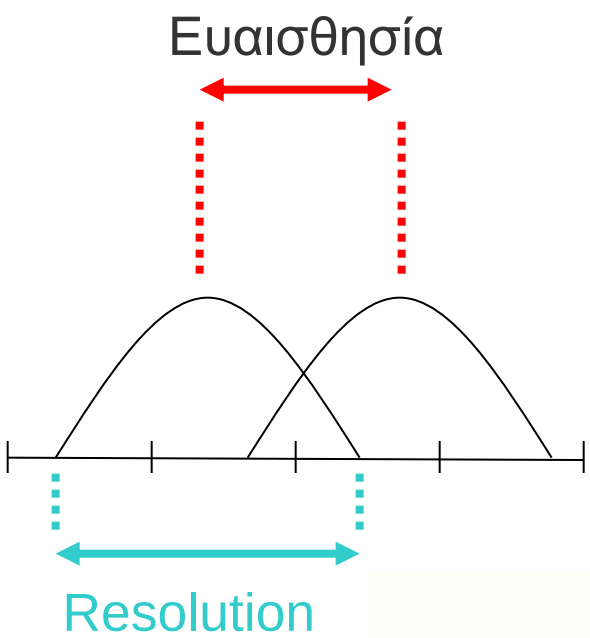
Resolution vs. Sensitivity

Resolution : Μεγάλη επίδραση στη διάκριση των πληθυσμών

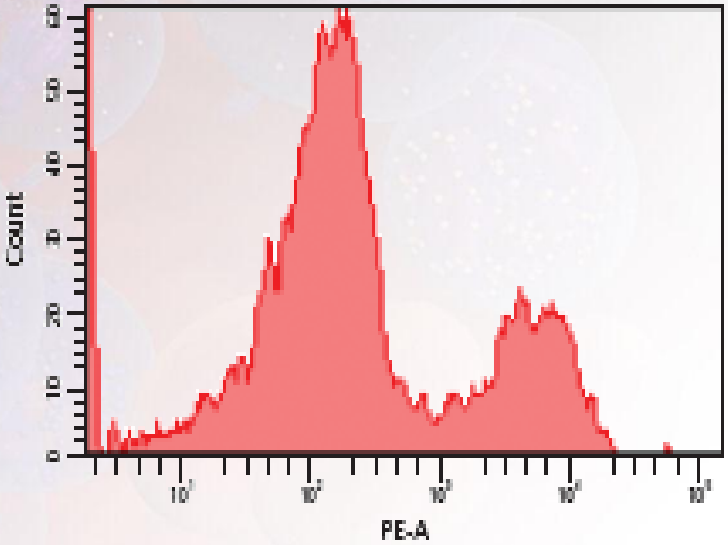
Μικρότερη Ευαισθησία, καλύτερο resolution

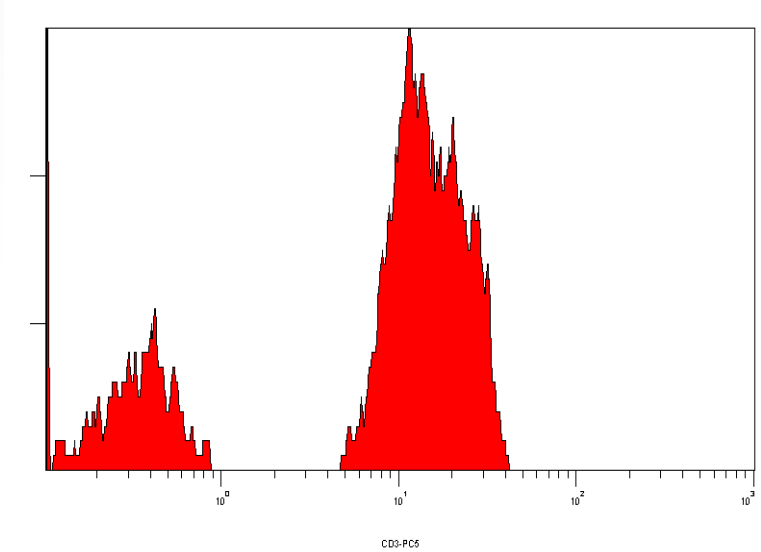


Καλύτερη Ευαισθησία, χειρότερο resolution



Εύρεση παθητικού φθορισμού





Ποια είναι η διαθέσιμη δυναμική περιοχή στη log κλίμακα?

Υπάρχει shift στο φθορισμό μεγαλύτερο από 2 δεκάδες?

Παράγοντες που επηρεάζουν την παρουσίαση των αποτελεσμάτων

- Εισαγωγή και μετατροπή Σήματος σε Λογαριθμική κλίμακα
- Επίδραση Θορύβου στα σήματα
- Ψηφιοποίηση Σήματος (DSP)
- Ακρίβεια Δεδομένων σε 4 Λογαριθμικές Δεκάδες
- Επίδραση DSP, Ανάλυσης (Resolution) και Ακρίβειας στα δεδομένα

Πλεονεκτήματα Ψηφιακής Τεχνολογίας

- **Υψηλότερο resolution** Απουσία «κενών» (picket fencing) στα ιστογράμματα
- **Εξαιρετική ακρίβεια** (<1.5% σφάλμα) σε 4 log δεκάδες
- **Εξαιρετική δυναμική Περιοχή**:
  - 3+ log δεκάδες για αξιοποίηση σημάτων

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- M Roederer, Spectral Compensation for Flow Cytometry: visualization Artifacts, Limitations and Caveats, Cytometry 45:194-205 (2001).
- C. Snow, Flow Cytometry Electronics, Cytometry Part A, 57A:63-69 (2004).
- XDP Electronics Whitepaper, Dan Fox, Analysis of Acquisition Architectures, 12 April 2007
- Shapiro, Practical Flow Cytometry, 4th Edition
- Beckman Coulter Inc