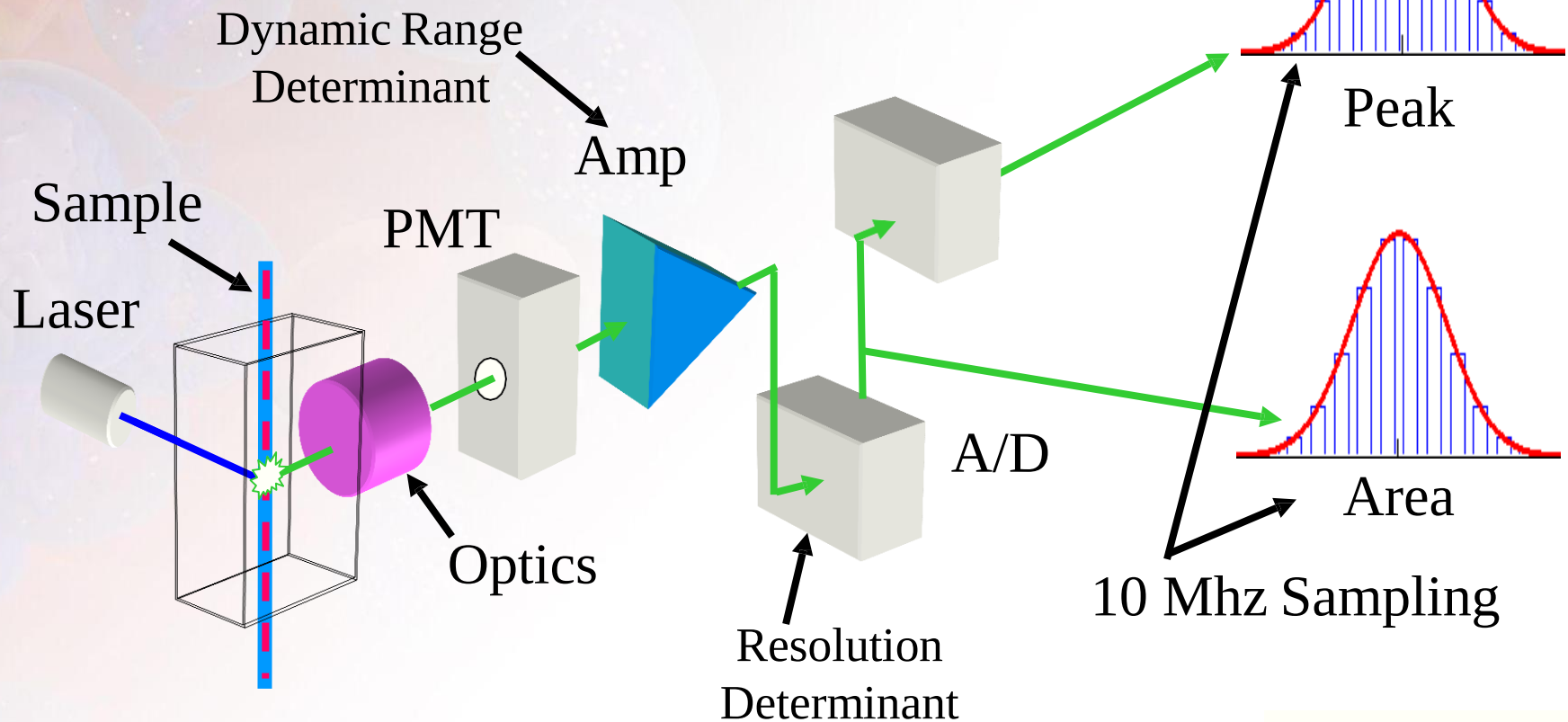


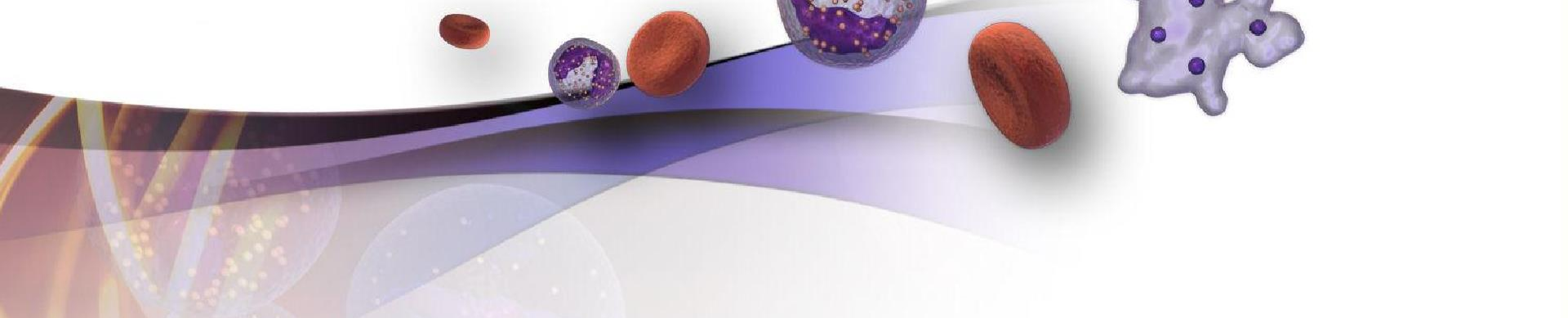


Compensation (Αντιστάθμιση Φθορισμών) και Ψηφιακή Τεχνολογία

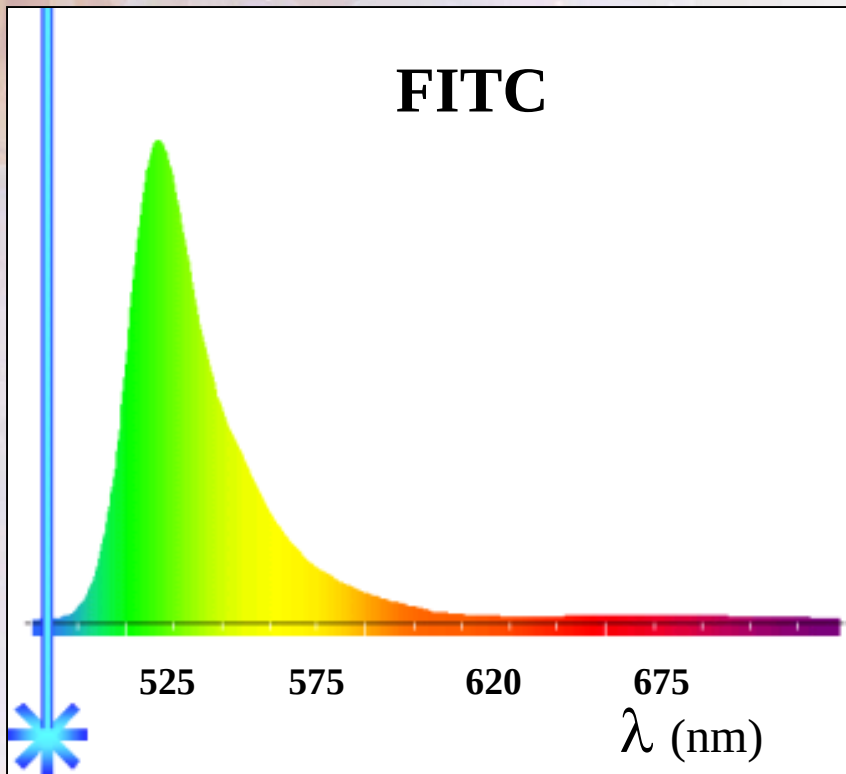
Μαρία Γεωργίου
Χημικός, PhD
Leriva Diagnostics

Block Διάγραμμα Κυτταρομετρητή





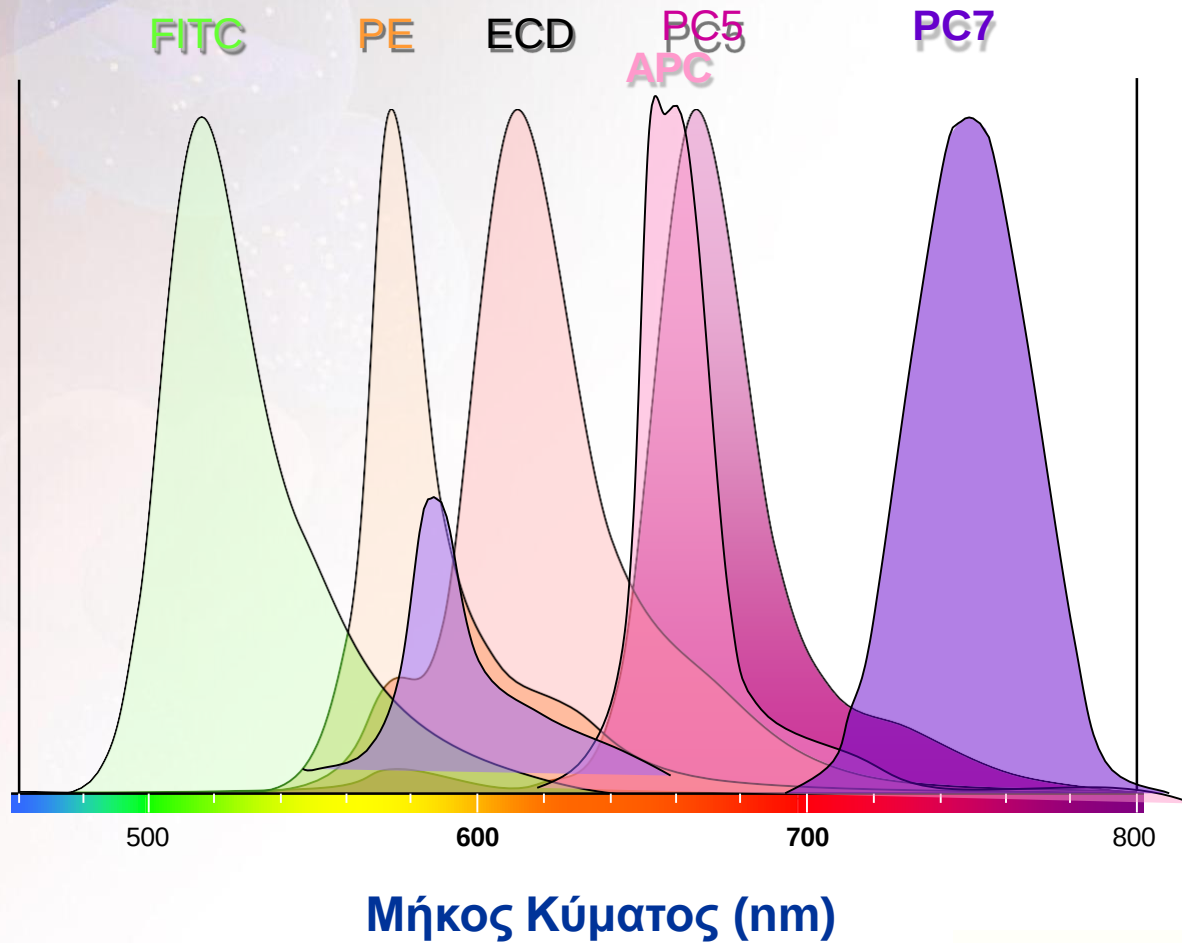
FITC



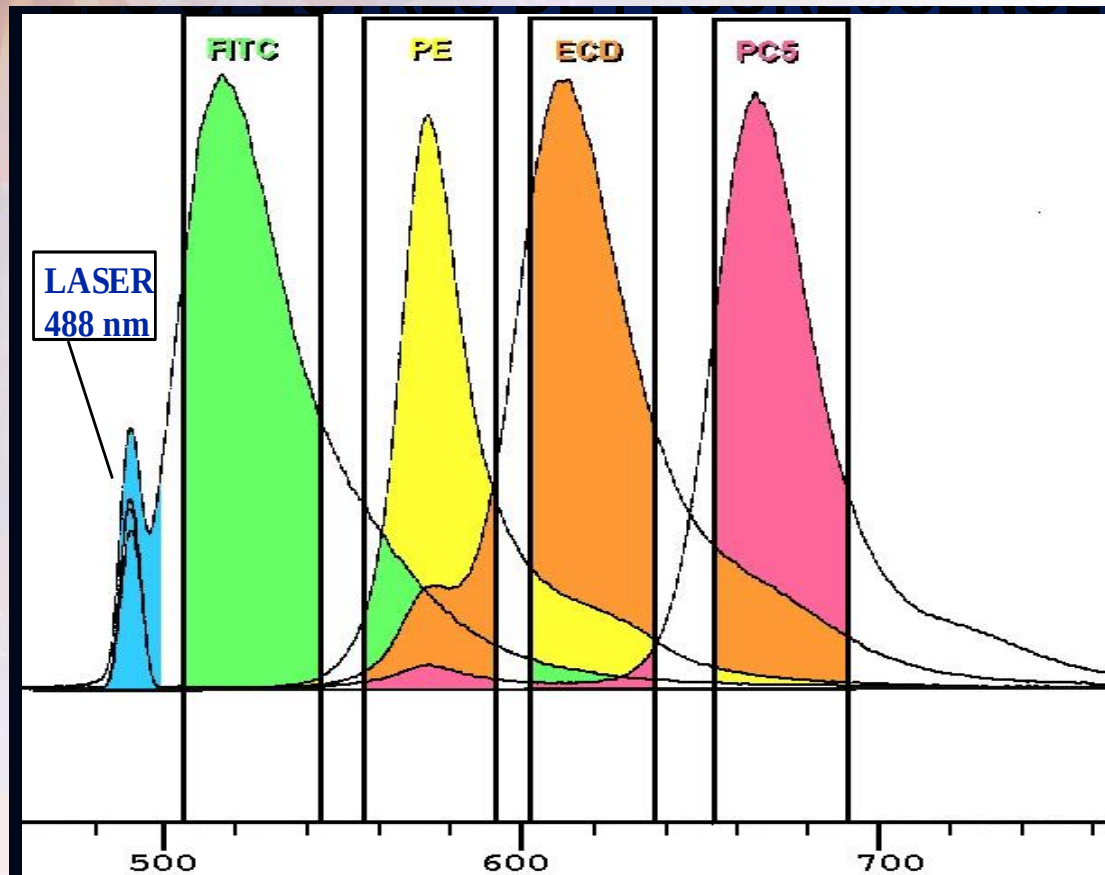
Κάθε φθορίζουσα Χρωστική
διαθέτει ένα συγκεκριμένο
φάσμα εκπομπής

Φάσματα Εκπομπής

Ένταση Φθορισμού



Τετραχρωμία - Φάσματα εκπομπής



Κατά τη μέτρηση οφείλουμε να απαλλαγούμε από τη αλληλοεπικάλυψη των διαφορετικών χρωστικών

Είναι υποχρεωτικό να προσδιορίσουμε σε κάθε ανιχνευτή το φάσμα που αντιστοιχεί αποκλειστικά σε μία χρωστική.

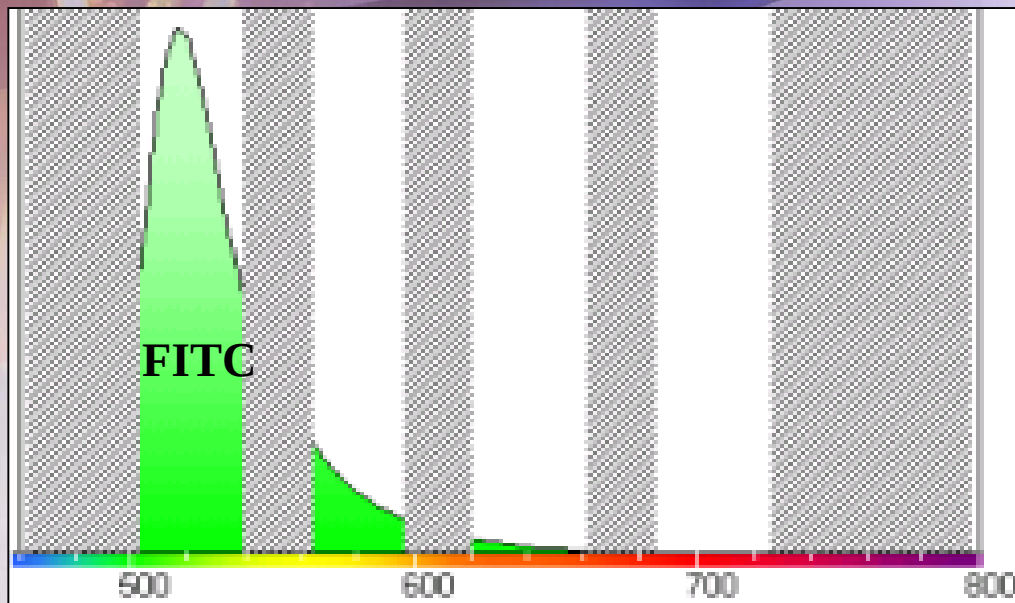
525

575

620

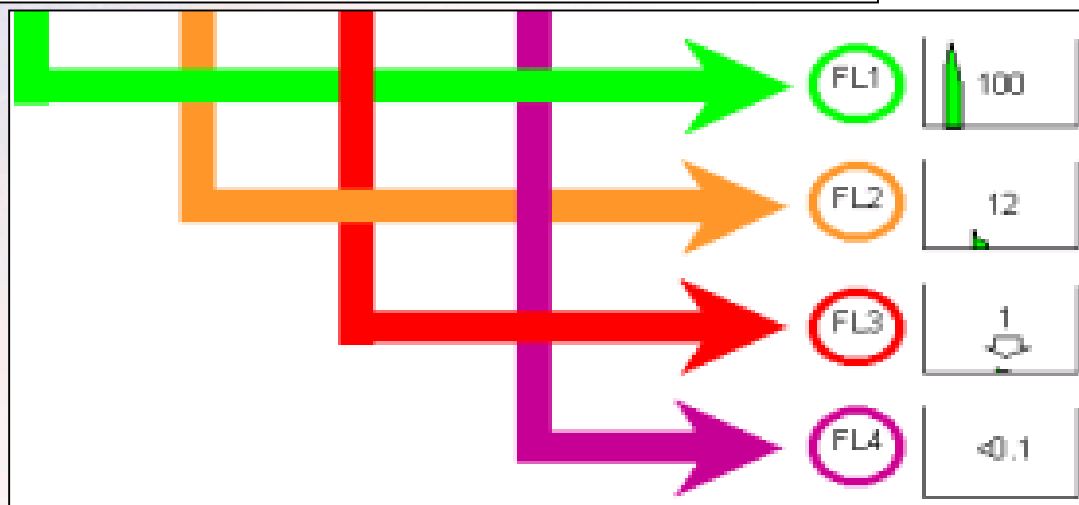
675

Παράδειγμα CD4 – FITC



Η χρωστική FITC ανιχνεύεται και σε άλλα κανάλια με διαφορετική ένταση

Μετρούμενο Σήμα



⇒ FITC at 525nm

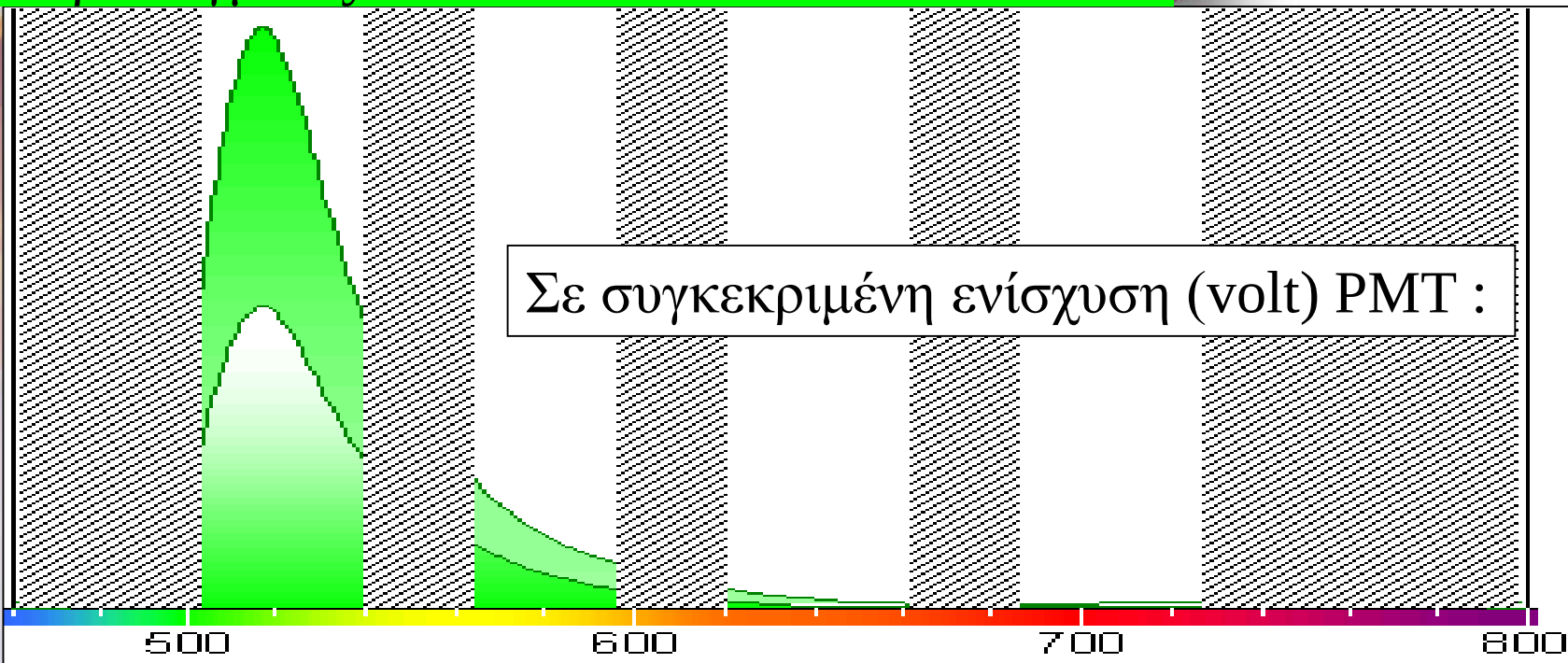
⇒ FITC at 575nm

⇒ FITC at 620nm

⇒ FITC at 675nm

Παράδειγμα Ly CD4 FITC και mono CD4 FITC

Σε συγκεκριμένη ενίσχυση (volt) PMT :



Cell		FL1 level	FL2 Level	FL3 Level	FL4 Level
Ly T4	Bright	500	60	5	0,4
Monocyte	Dim	250	30	2,5	0,2
Ratio (%)		100	12	1	<0,1

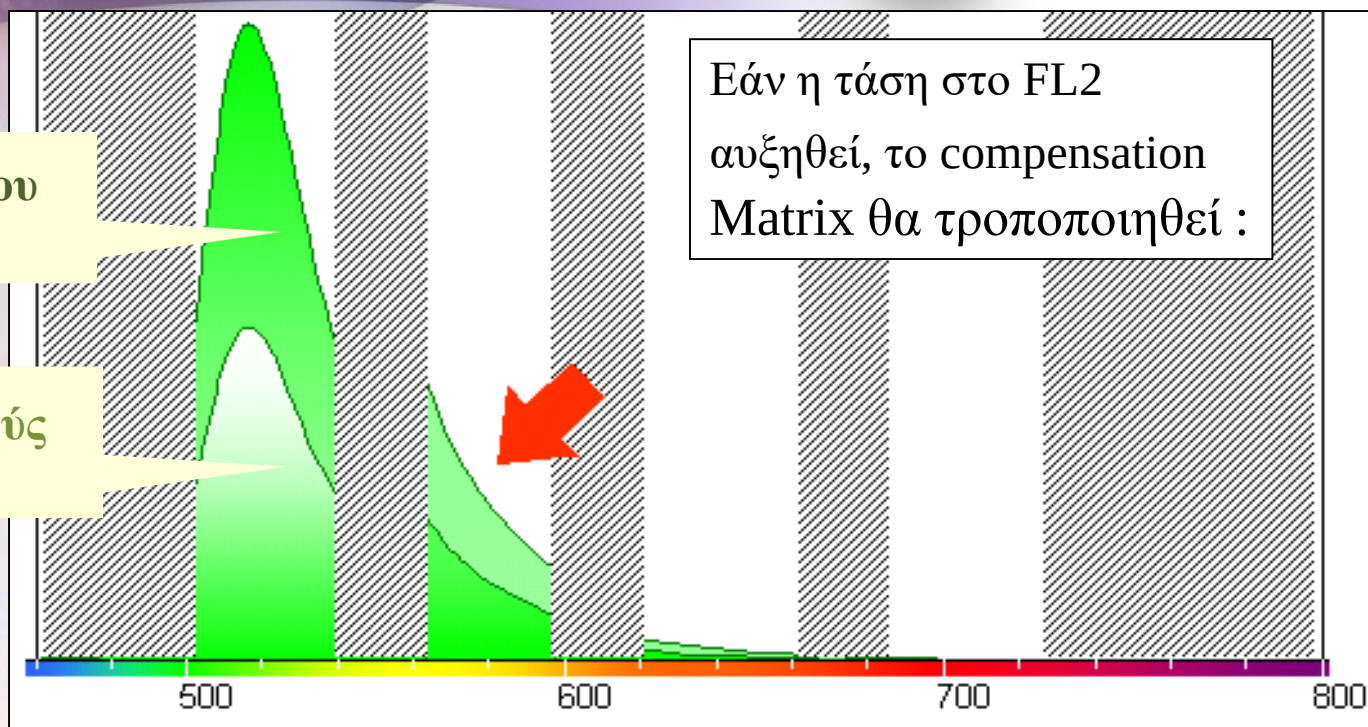
Ο λόγος των τιμών των εντάσεων παραμένει σταθερός ανεξάρτητα από την ένταση των φθορισμών

Παράδειγμα Ly CD4 FITC και mono CD4 FITC

Κύτταρο Έντονου
Φθορισμού

Εάν η τάση στο FL2
αυξηθεί, το compensation
Matrix θα τροποποιηθεί :

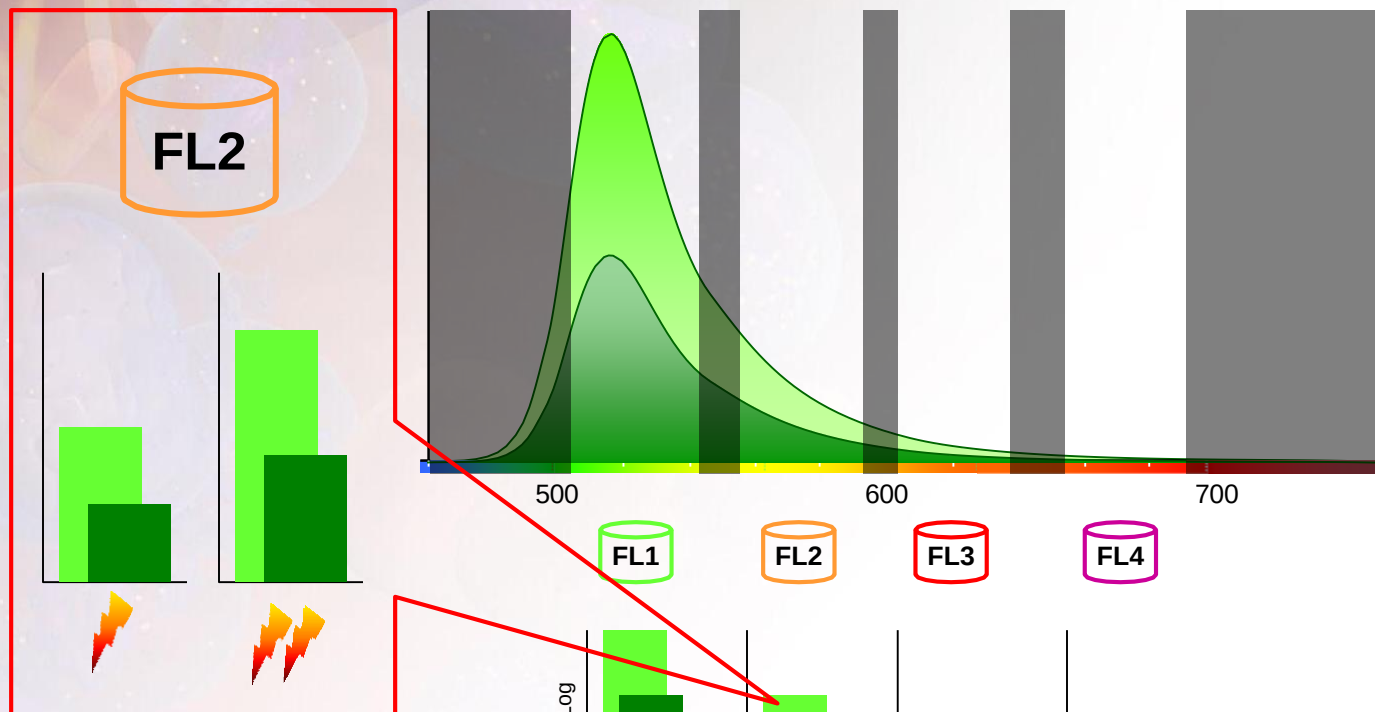
Κύτταρο Ασθενούς
Φθορισμού



Cell	FL1 level	FL2 level	FL3 level	FL4 level
Ly T4 Bright	500	120	5	0,4
Monocyte Dim	250	60	2,5	0,2
Ratio (%)	100	24	1	<0,1

Αλλαγή της τάσης (Volts) σε ένα PMT => αλλαγή στο λόγο εντάσεων φθορισμού

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

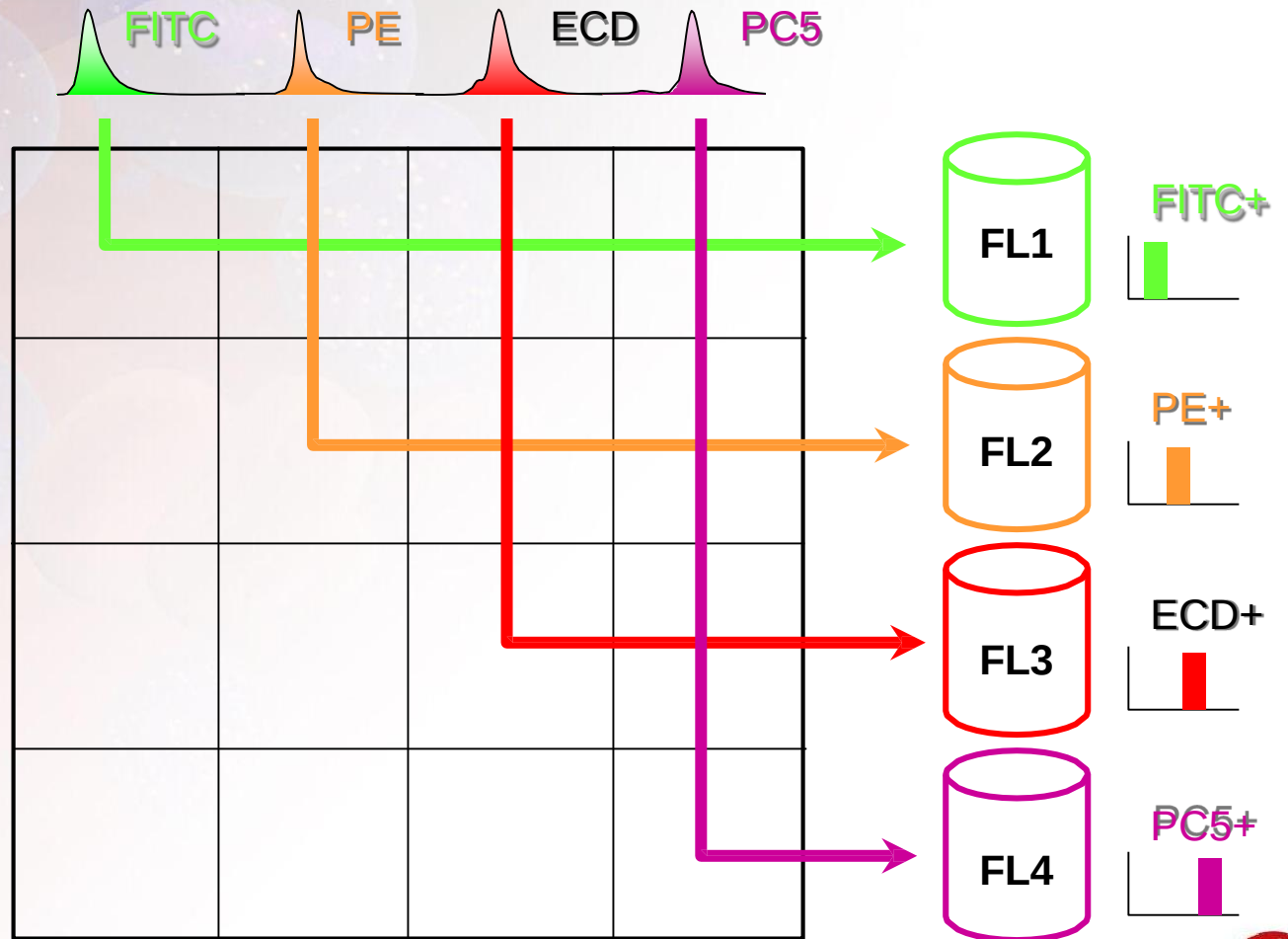


Ένταση Φθορισμού	500	60 120	5	0.4
Λόγος Εντάσεων (%)	100	12 24	1	<0.1
Ένταση Φθορισμού	250	30 60	2.5	0.2

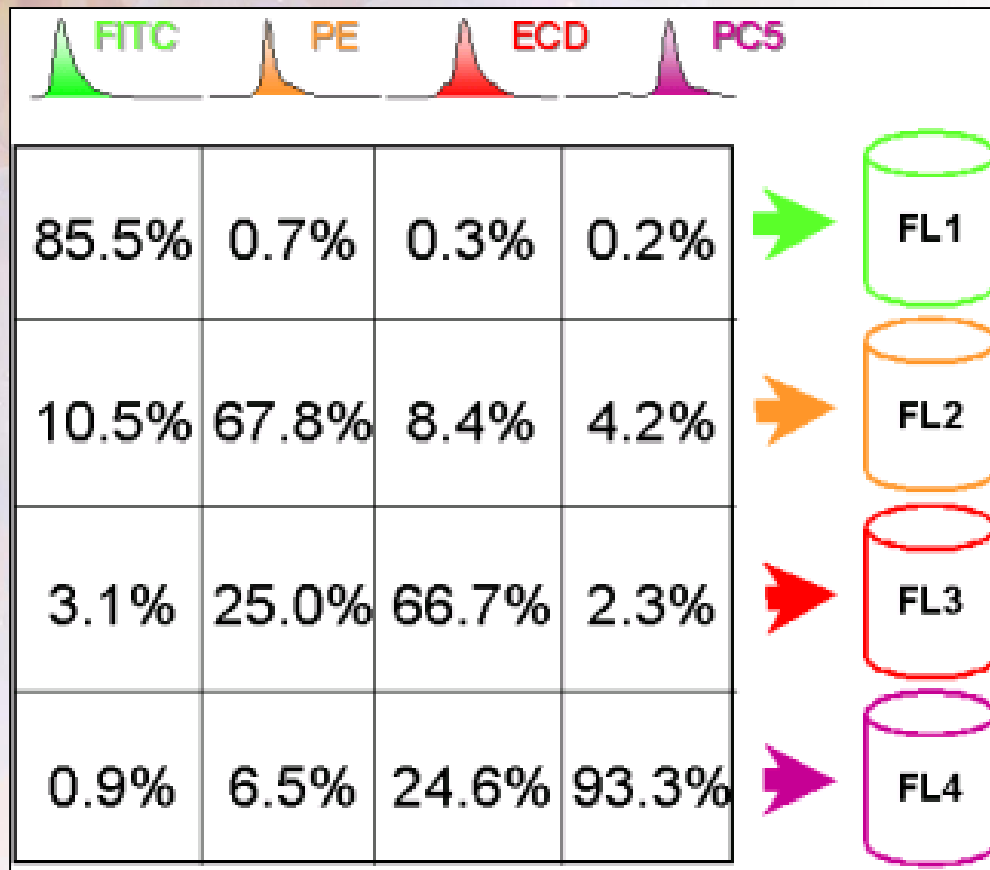
Αλλαγή της τάσης (Volts) σε ένα PMT συνεπάγεται και αλλαγή στο λόγο των εντάσεων φθορισμού και προς τους άλλους PMTs

Τι Θέλουμε ;

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



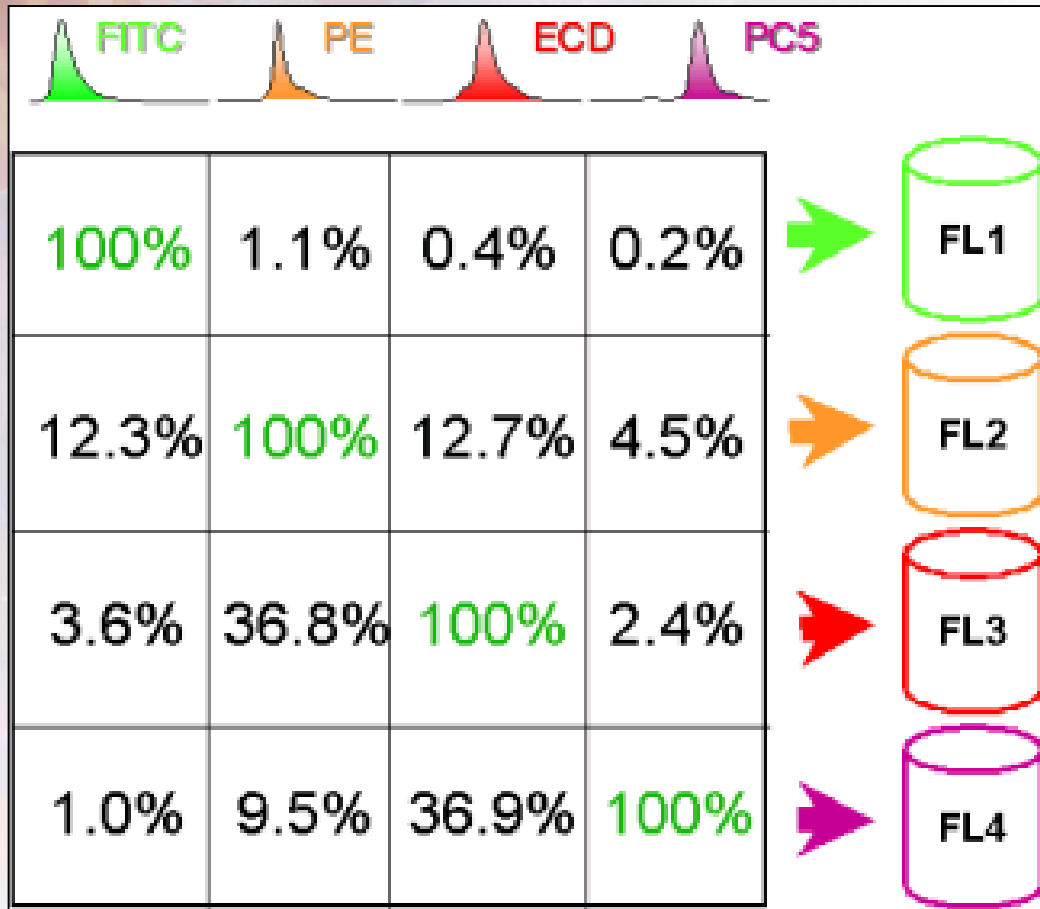
4 Color Staining Example : Signal measurement on each detector



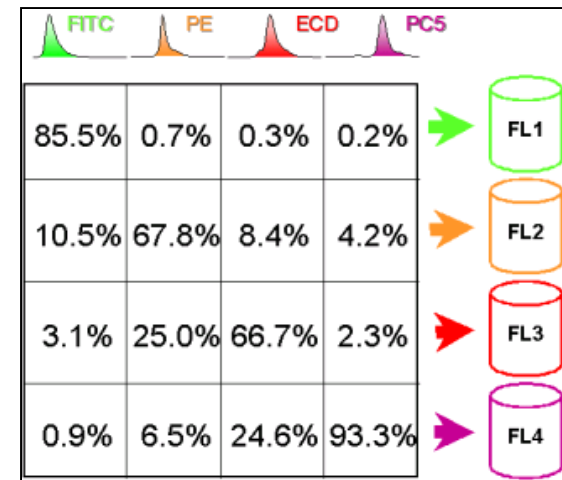
100% FITC **100% PE** **100% ECD** **100% PC5**

Intensity value (%) of
each fluorochrome
measured on specific
individual detector

4 Color Staining Example : Signal rationalized at 100%

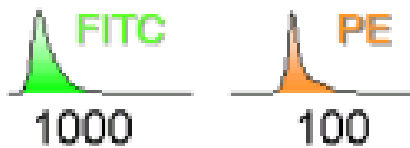


Fluorescence Subtraction
Matrix **RATIONALIZED**
at **100%**



4 Color Staining Example

Signal_{IN}



x crosstalk matrix

100%	1.1%
12.3%	100%

Example of a double staining in a single cell (Ly T4 cell stained with CD4 FITC and CD3 PE)

= PMT_{VALUE}

FL1	1001.1
FL2	223.0

FITC	PE	ECD	PC5	
100%	1.1%	0.4%	0.2%	→ FL1
12.3%	100%	12.7%	4.5%	→ FL2
3.6%	36.8%	100%	2.4%	→ FL3
1.0%	9.5%	36.9%	100%	→ FL4

4 Color Staining Example

PMT VALUE

FL1

FL2

1001.1

223.0

x subtraction matrix

%FL1

100.00%

-1.10%

%FL2

-12.30%

100.00%

The subtraction matrix
« subtracts » the
corresponding value from
the table : the final results
are not optimum



FITC+

998.65

0.135%



PE+

99.86

0.140%

EXAMPLE WITH TAXES

A basic example ...

Price without Taxe

\$100

Taxe

10%

Final Price with Taxe

\$110

Final Price with Taxe

\$110

Taxe

10%

Price without Taxe

~~= \$110 - 10% = \$99 and not \$100~~

4 Color Staining Example

PMT VALUE

FL1

FL2

1001.1

223.0

x compensation matrix

%FL1

100.14%

-1.10%

%FL2

-12.32%

100.14%

The Advanced Digital Matrix doesn't adjust the « rationalization » at 100%, but at a slightly higher value to correct the error encountered in the classical subtraction matrix



1000.05

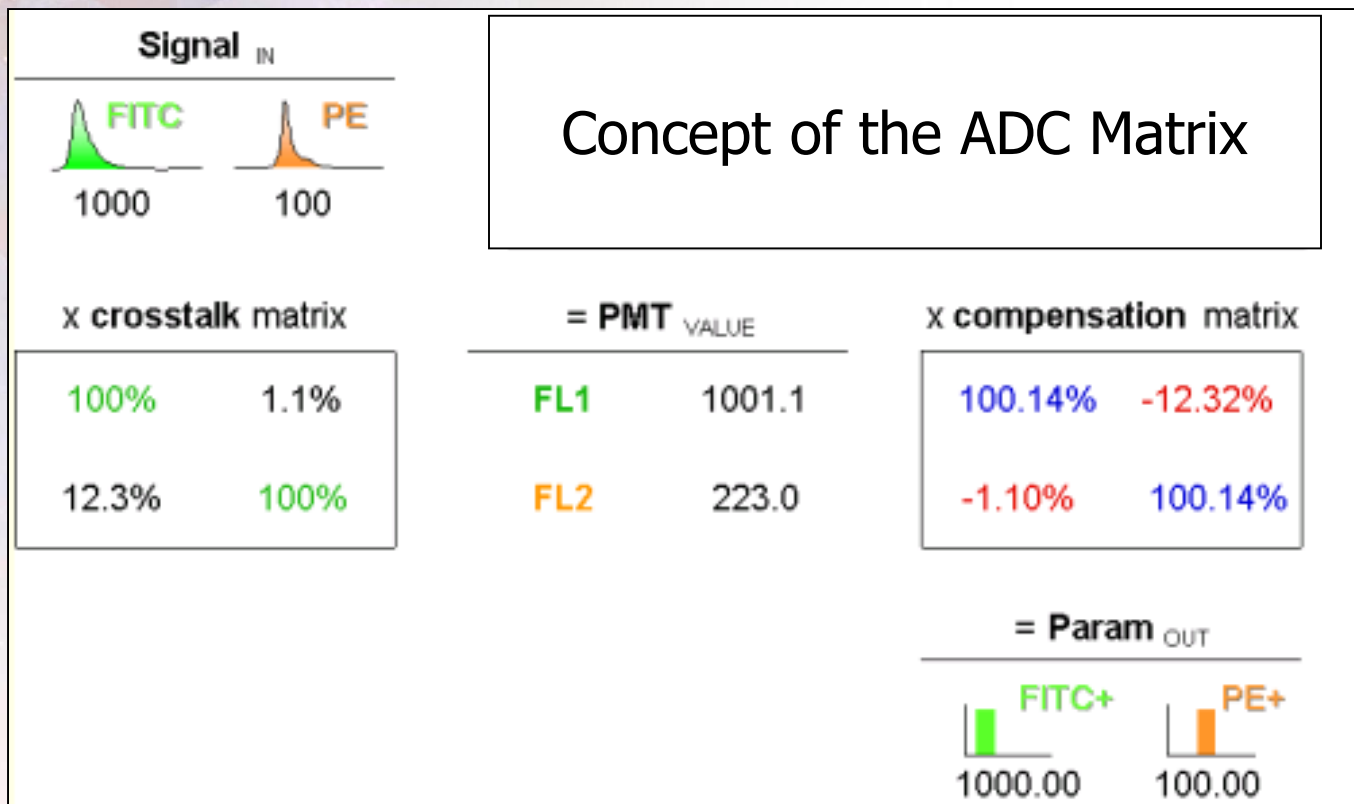
-0.005%



99.98

0.020%

4 Color Staining Example : The ADC Matrix



4 COLOR STAINING EXAMPLE

x **crosstalk** matrix

100%	1.1%
12.3%	100%

x **compensation** matrix

100.14%	-1.10%
-12.32%	100.14%

100%	1.0%
12.3%	100%

100.12%	-1.00%
-12.32%	100.12%

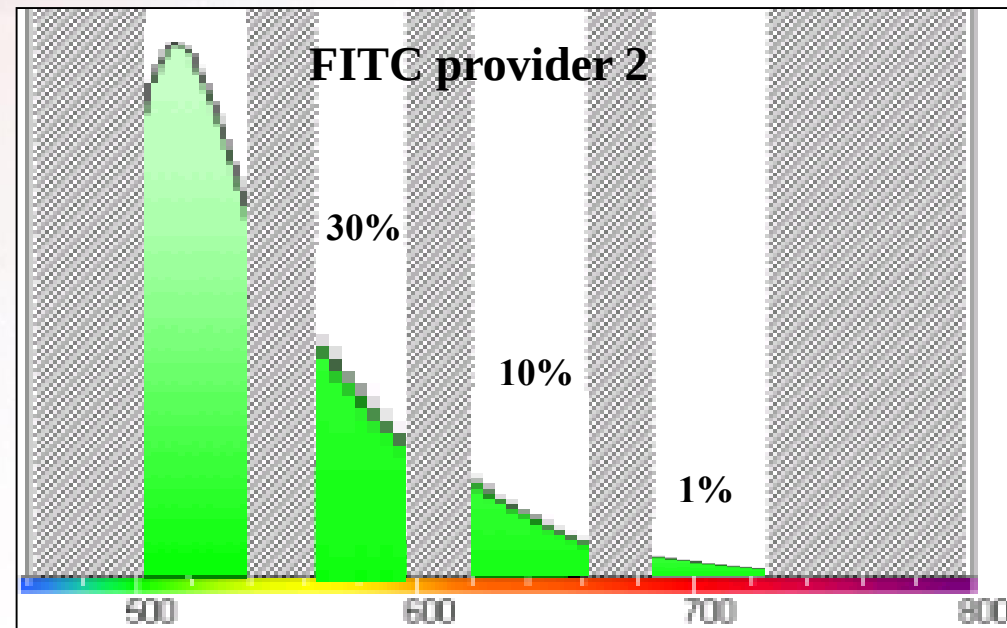
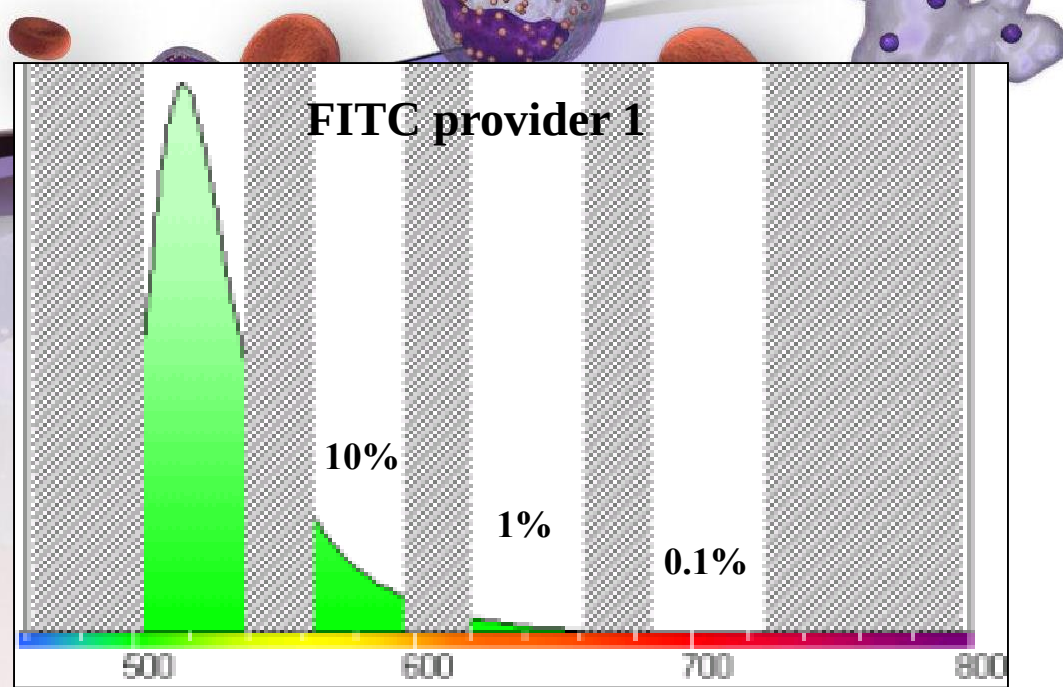
The ADC Matrix corrects automatically the « rationalization » value which is dependent of the compensation value

It exists a matrix for each pair of fluorochrome combinations :

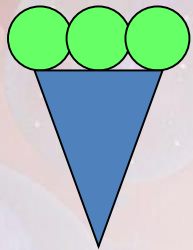
- 2 C = 1 matrix
- 3 C = 3 matrixes
- 4 C = 6 matrixes
- 5 C = 10 matrixes

**A specific
provider :**

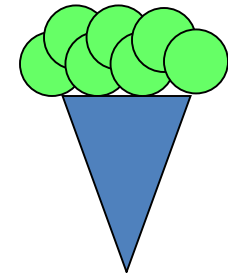
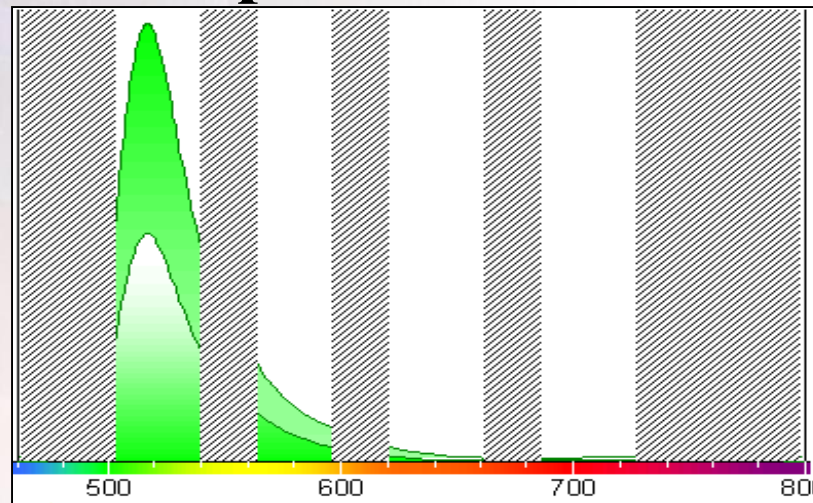
**a specific
molecule
spectrum**



The ratio F/P doesn't affects the compensation values...



~~Lot 1~~
~~Anti CD4~~
Anti CD8



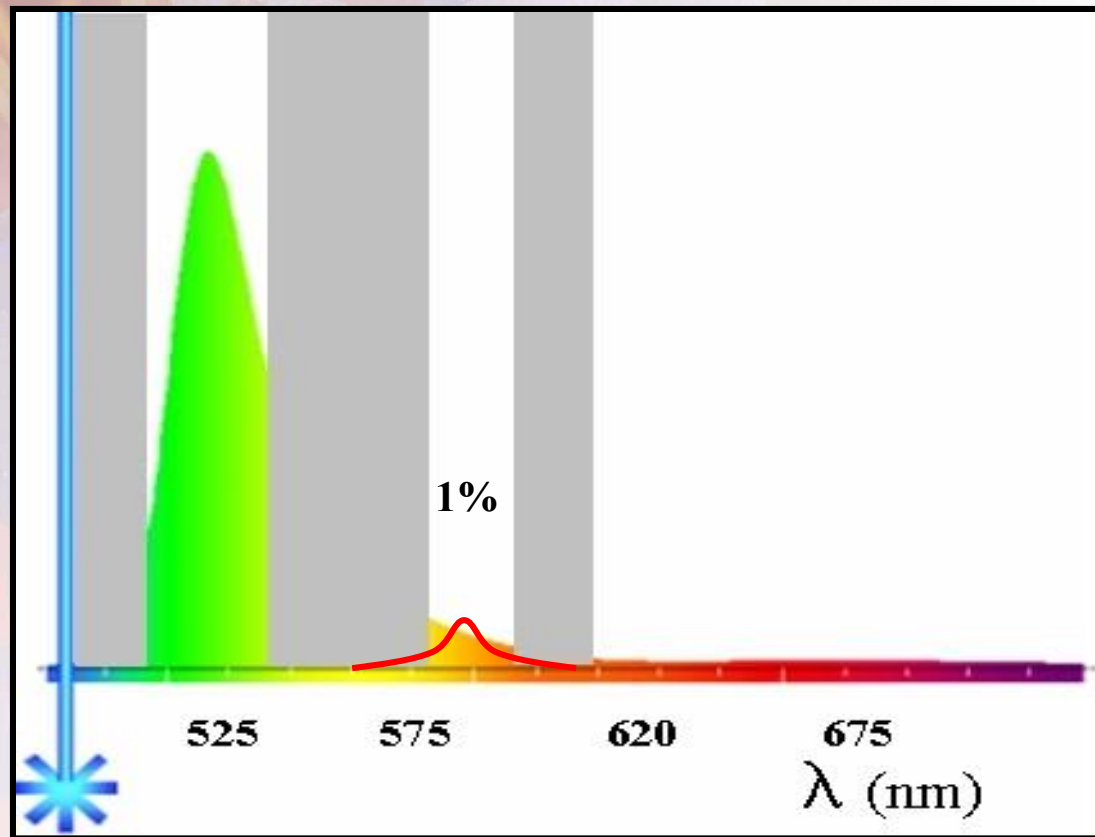
~~Lot 2~~
~~Anti CD4~~
Anti CD8

Cell	FL1	FL2	FL3	FL4
Bright	500	60	5	0,4
Dim	250	30	2,5	0,2
Ratio (%)	100	12	1	<0,1

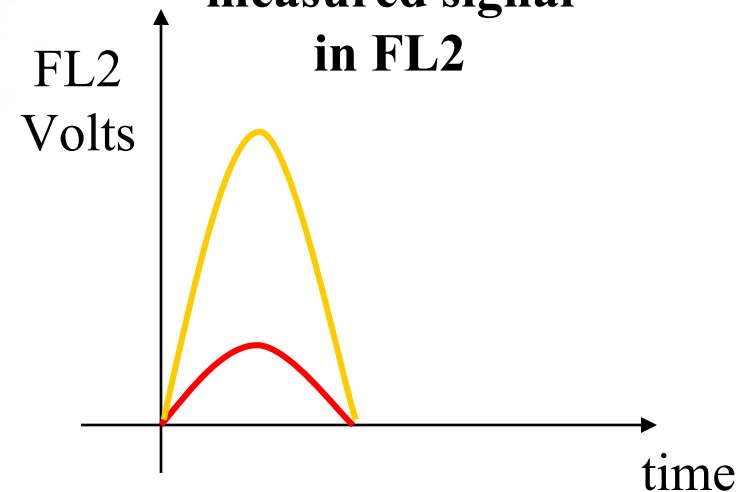
... but affects the fluorescence intensities !!!

Compensation Values :

(Extreme case nb 1)



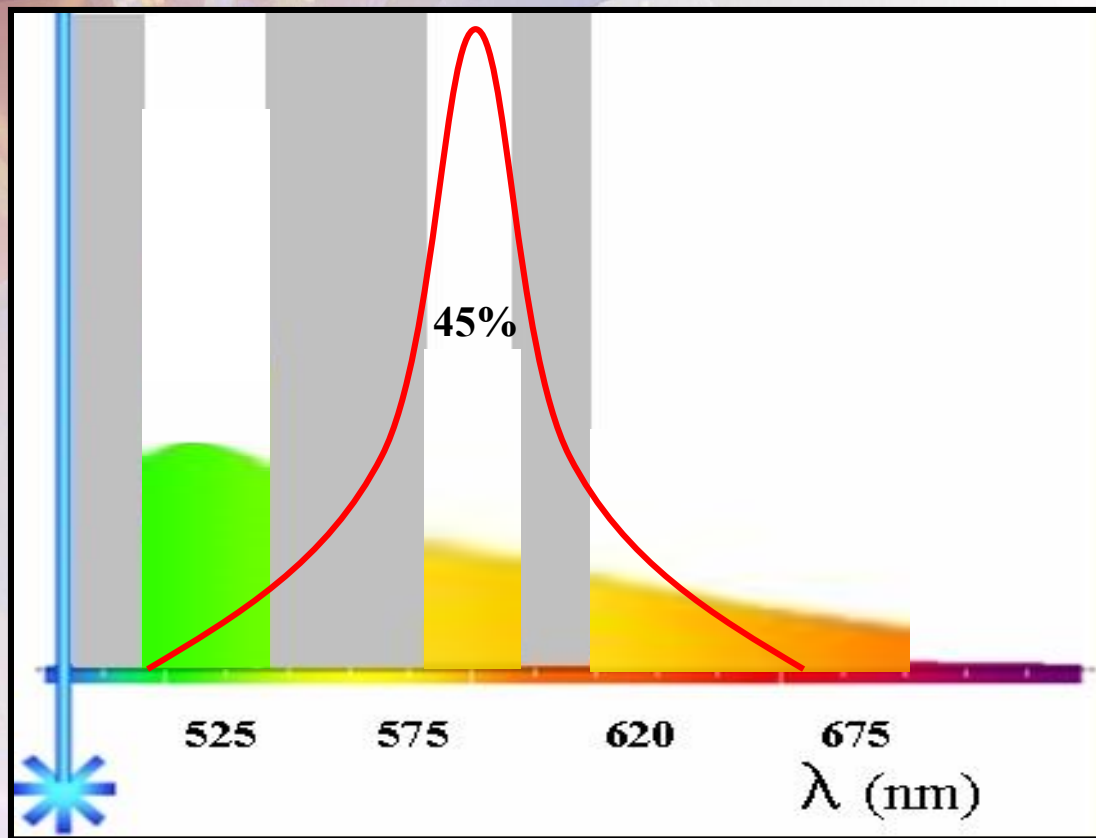
1% compensation
represents 70% of
measured signal
in FL2



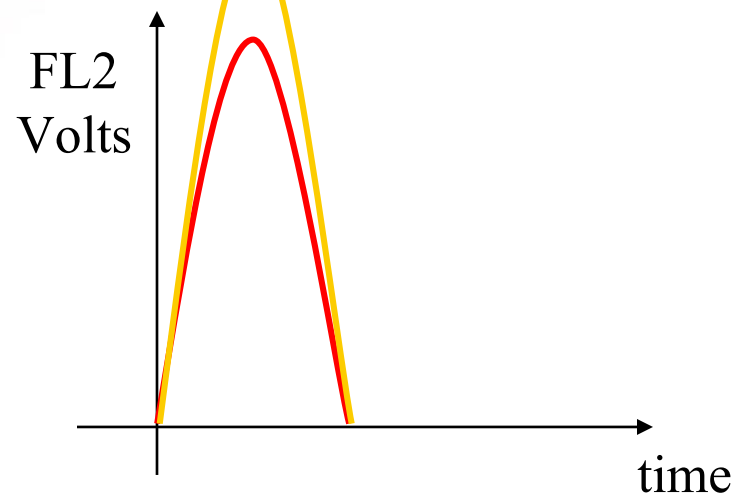
1.1% = high « over-compensation »
0.9% = high « under-compensation »

Compensation Values :

(Extreme case nb 2)



**45% compensation
represents only 10%
of measured signal
in FL2**



**50% = slightly over-compensated
40% = slightly under-compensated**



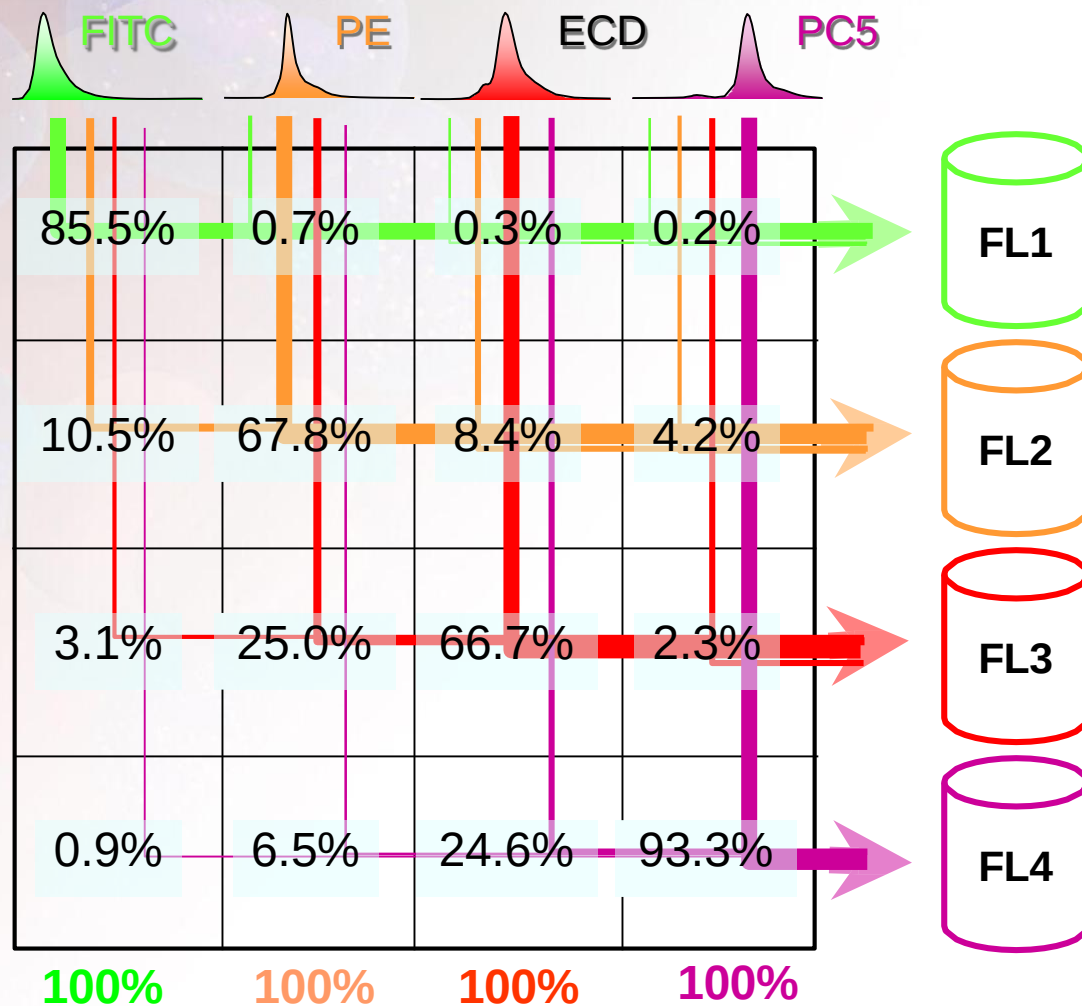
Compensation Values :

What is important :

It is not the compensation value itself,

But the precision of this value !!!

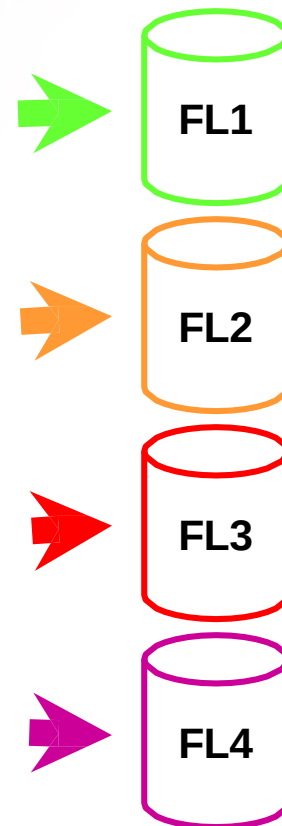
Πίνακας Crosstalk (Μετρηθέν)



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%



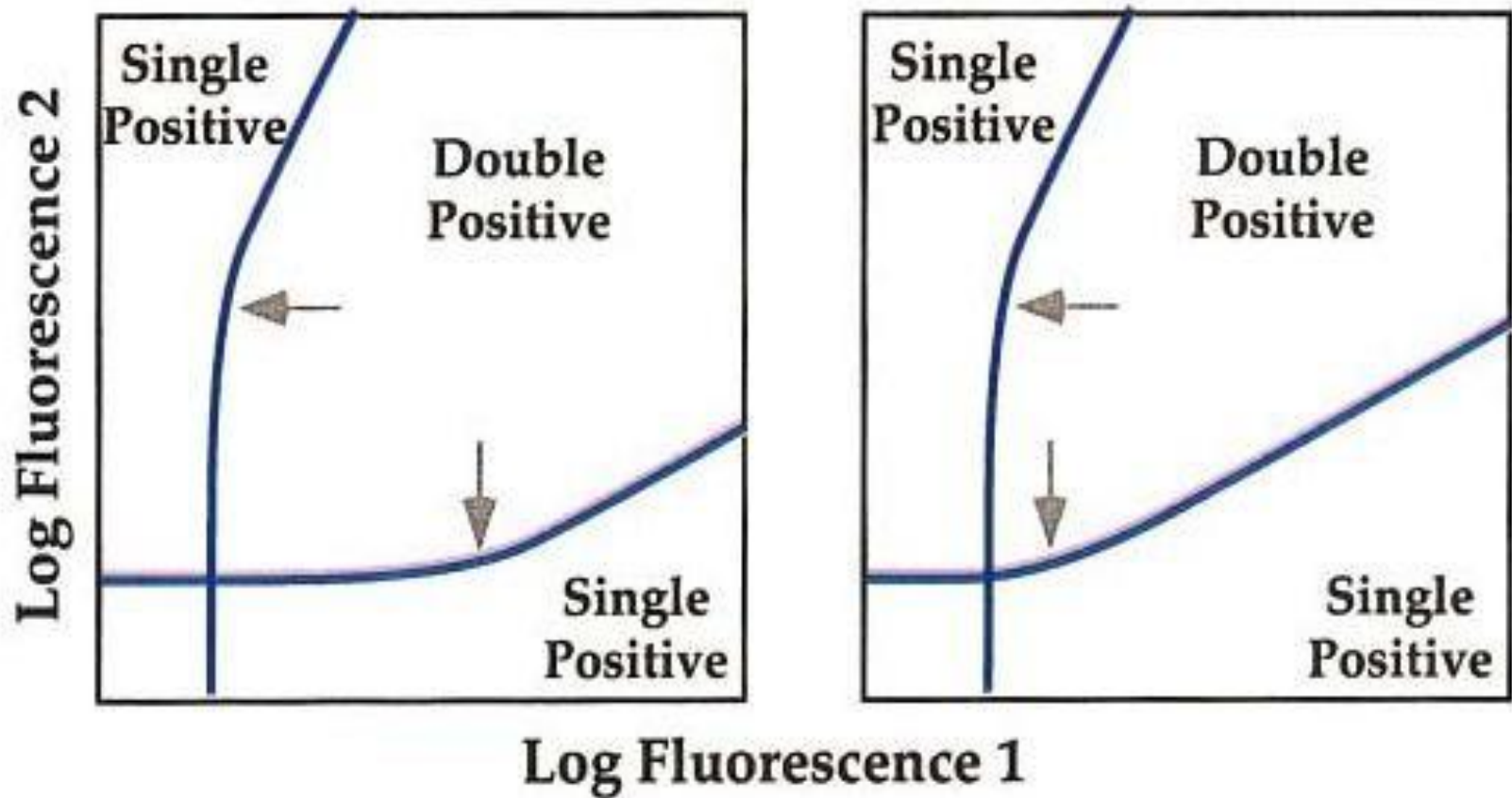


Αντιστάθμιση Φθορισμών

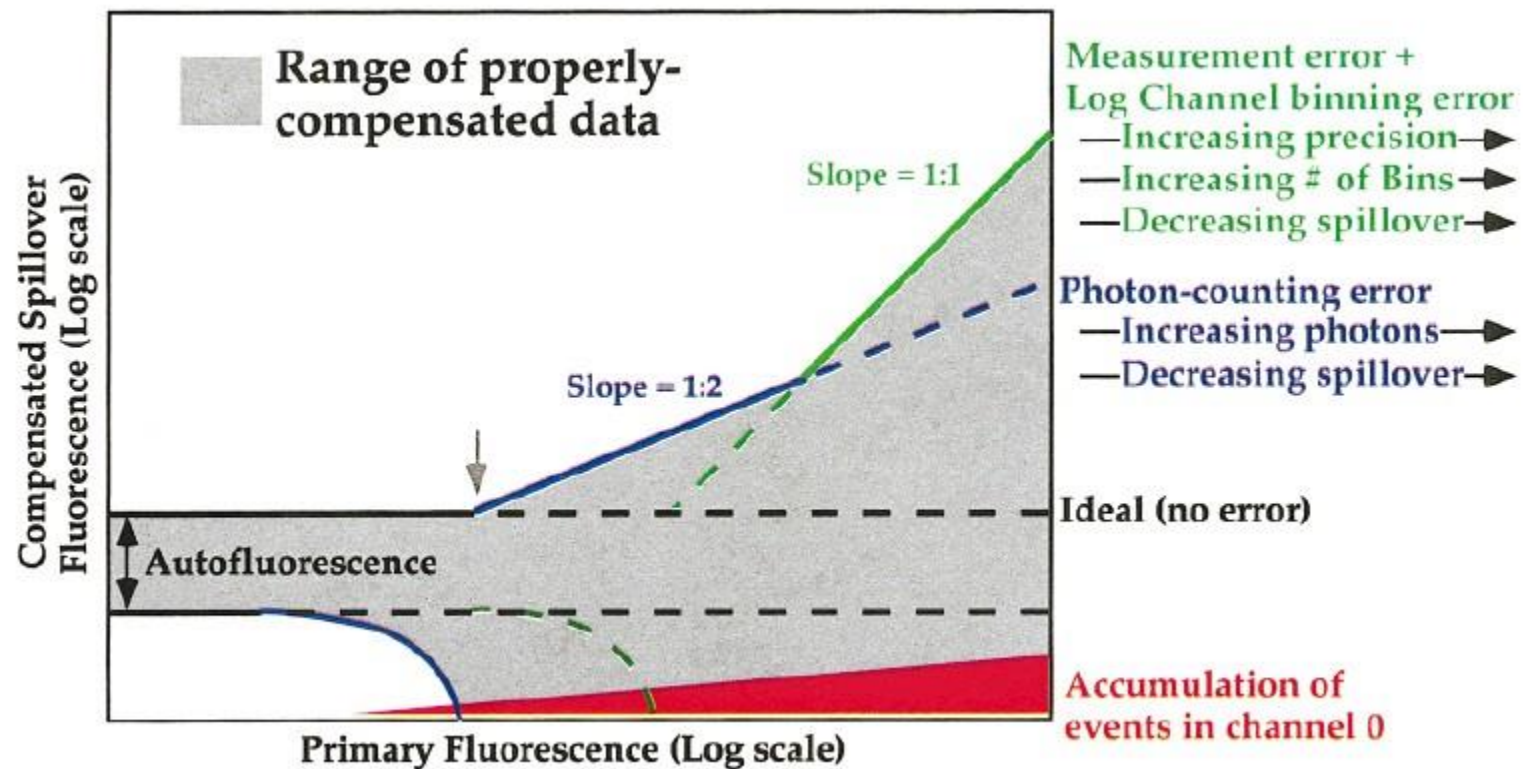
A. Μέσω μηχανήματος (*Instrument Compensation*)



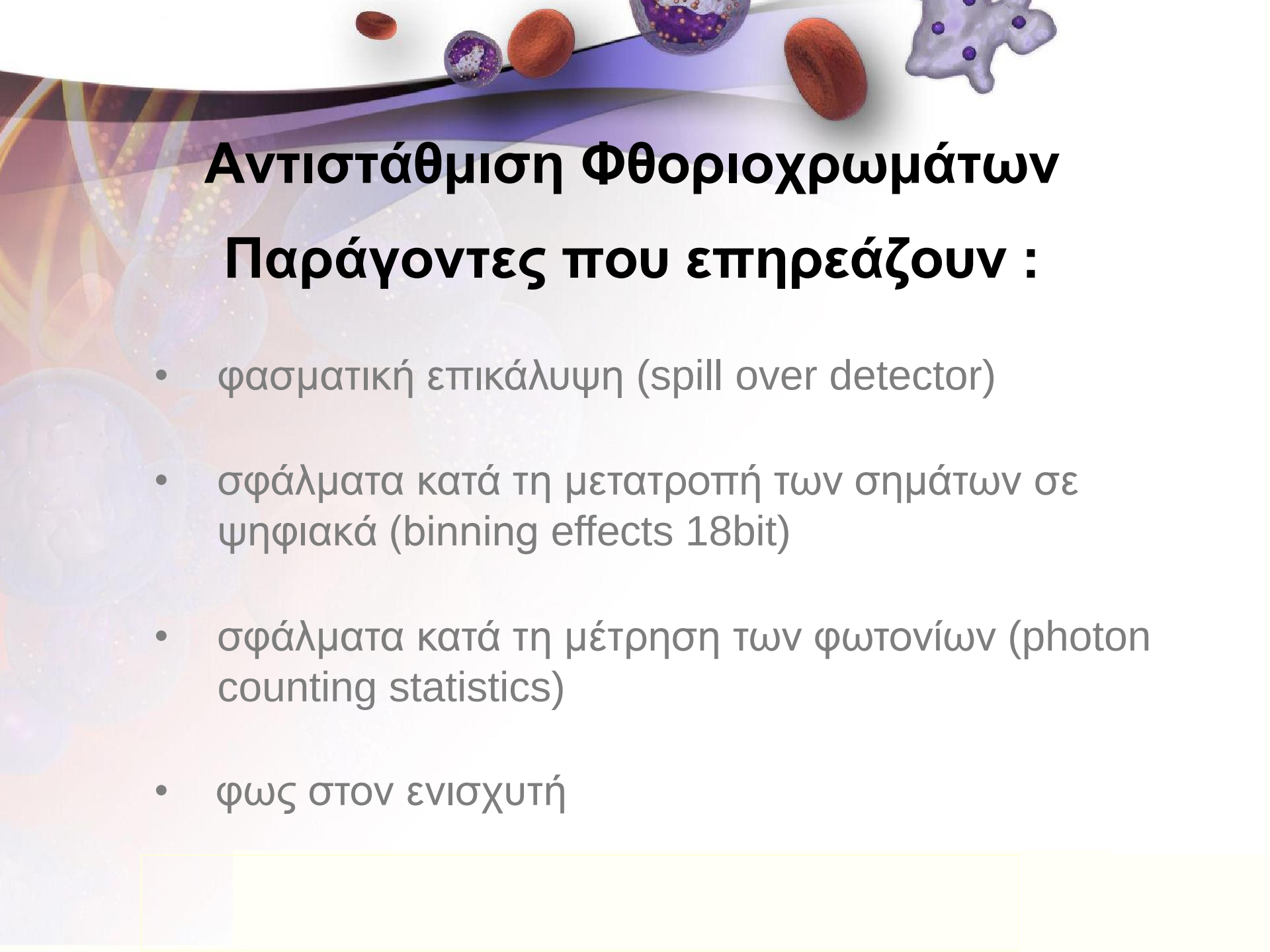
B. Μέσω Λογισμικού (*Software Compensation*)



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).

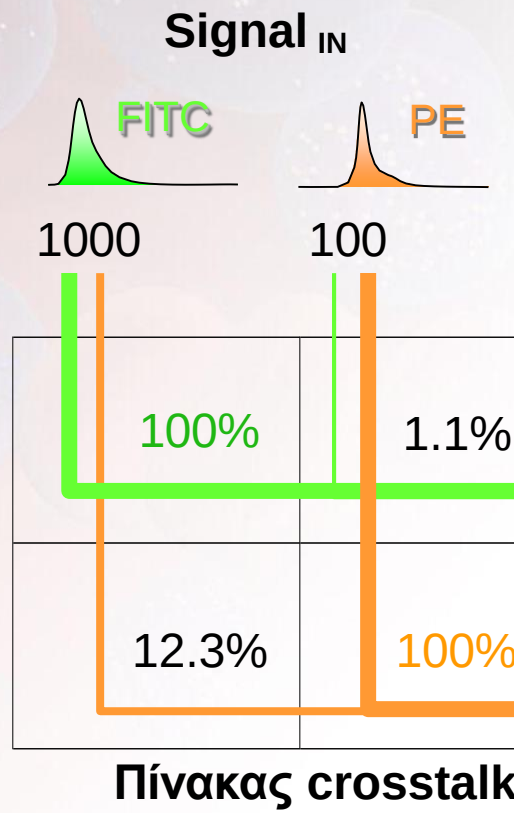


Αντιστάθμιση Φθοριοχρωμάτων

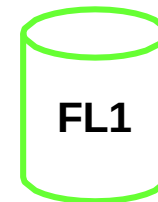
Παράγοντες που επηρεάζουν :

- 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.



Measured Value_{OUT}

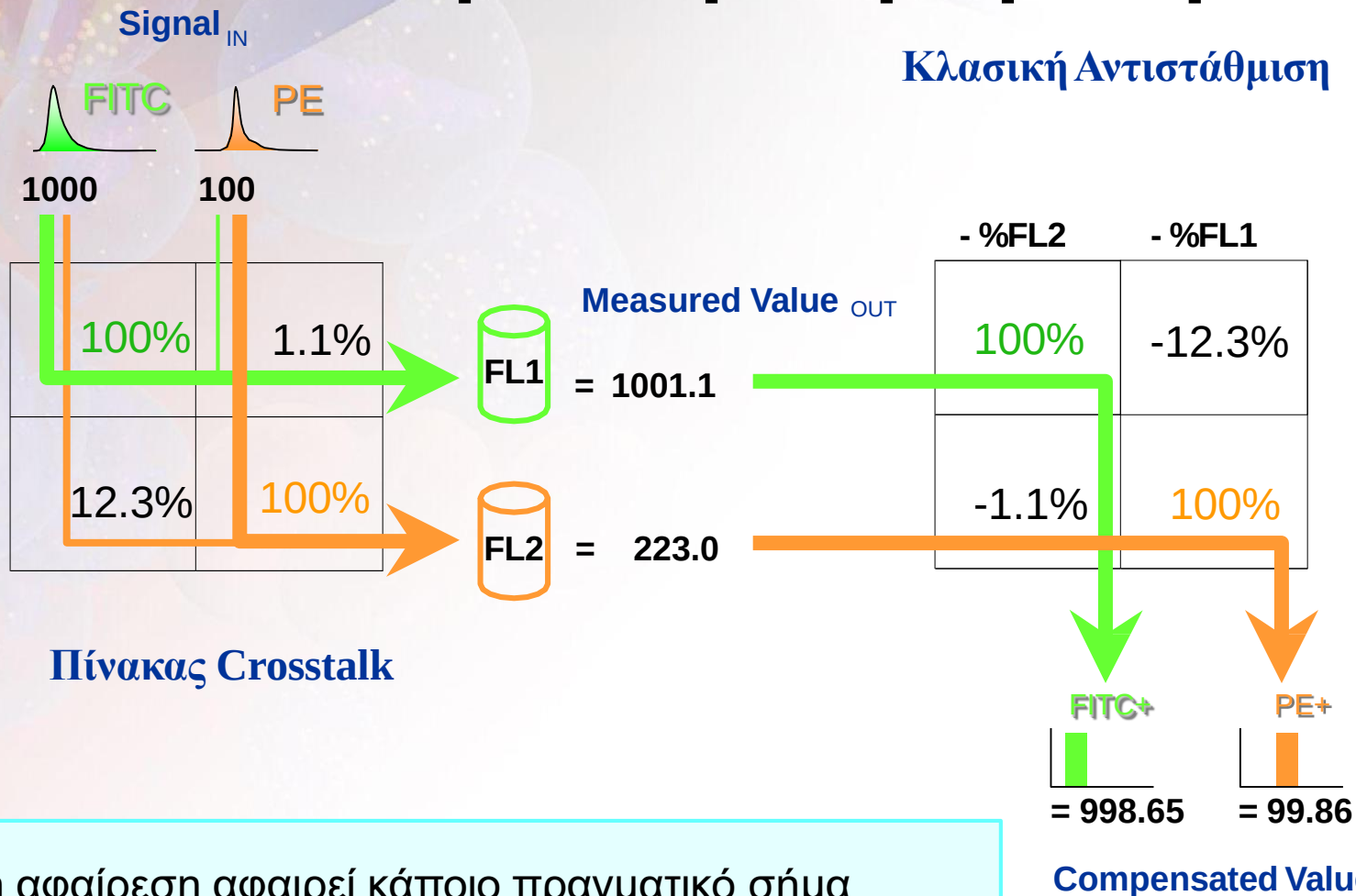
$$= 1001.1$$



$$= 223.0$$

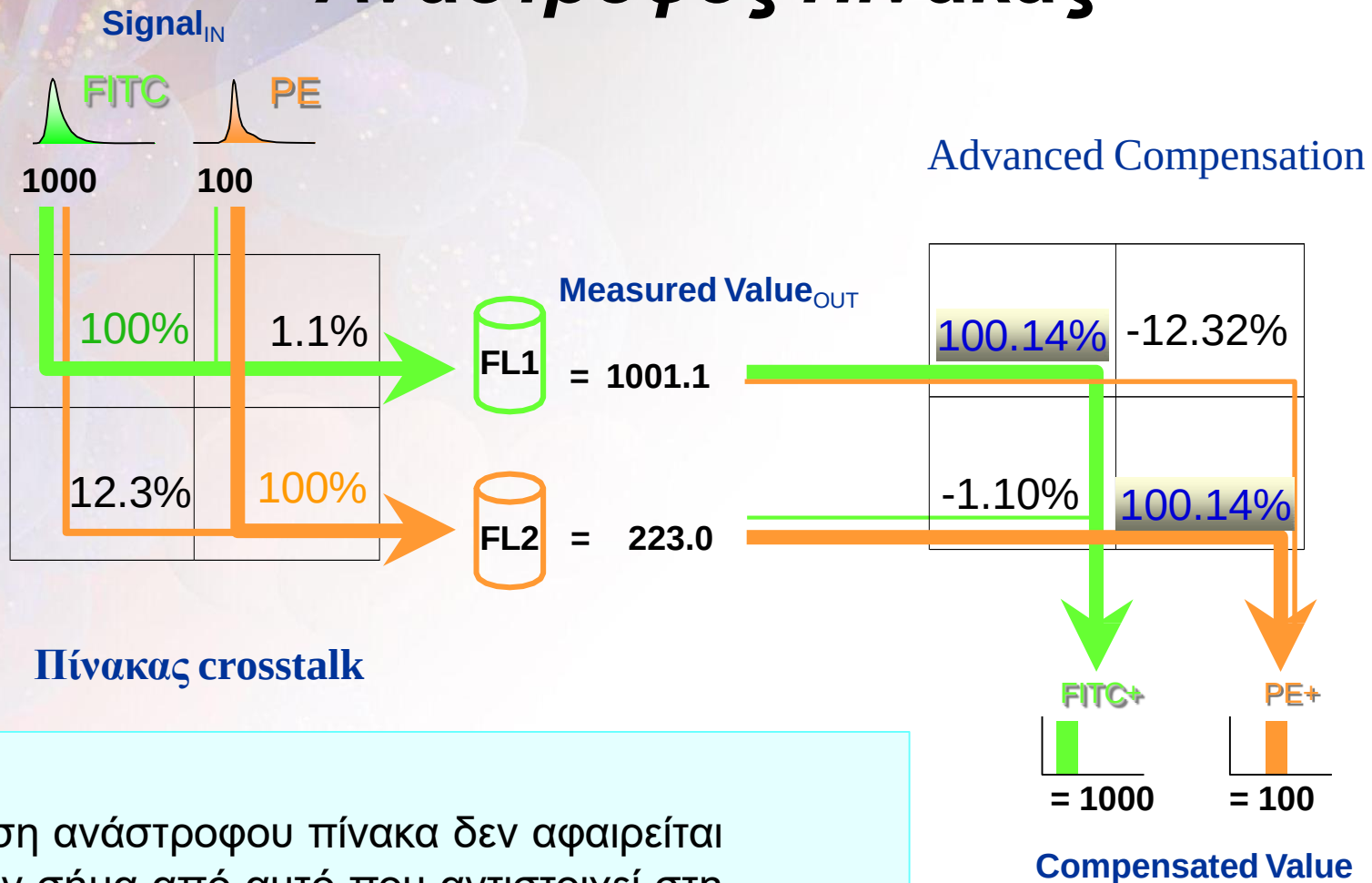
Η Απλή Λύση : Αφαίρεση

Κλασική Αντιστάθμιση

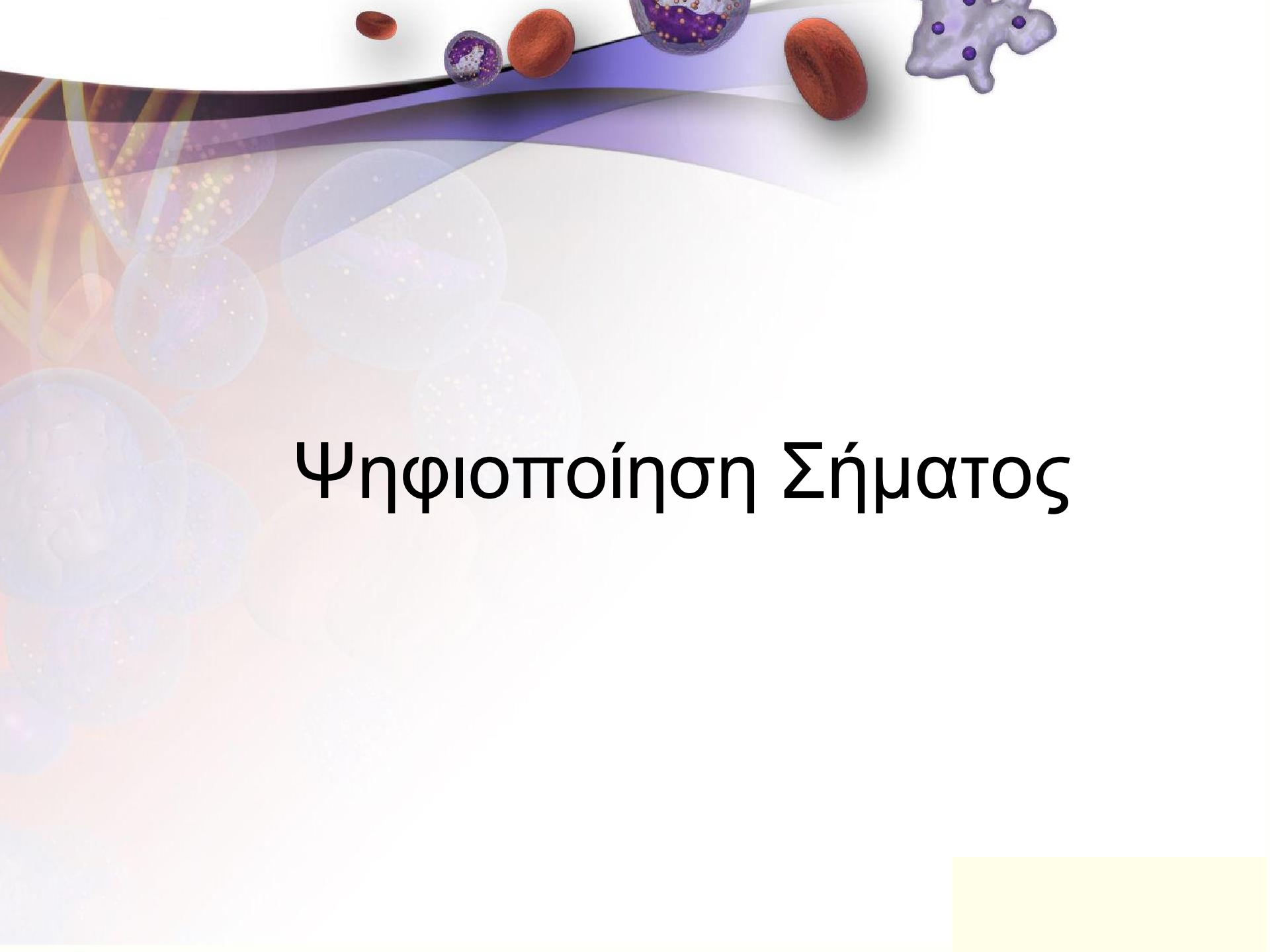


Η απλή αφαίρεση αφαιρεί κάποιο πραγματικό σήμα επιπλέον αυτού που αντιστοιχεί στη φασματική επικάλυψη

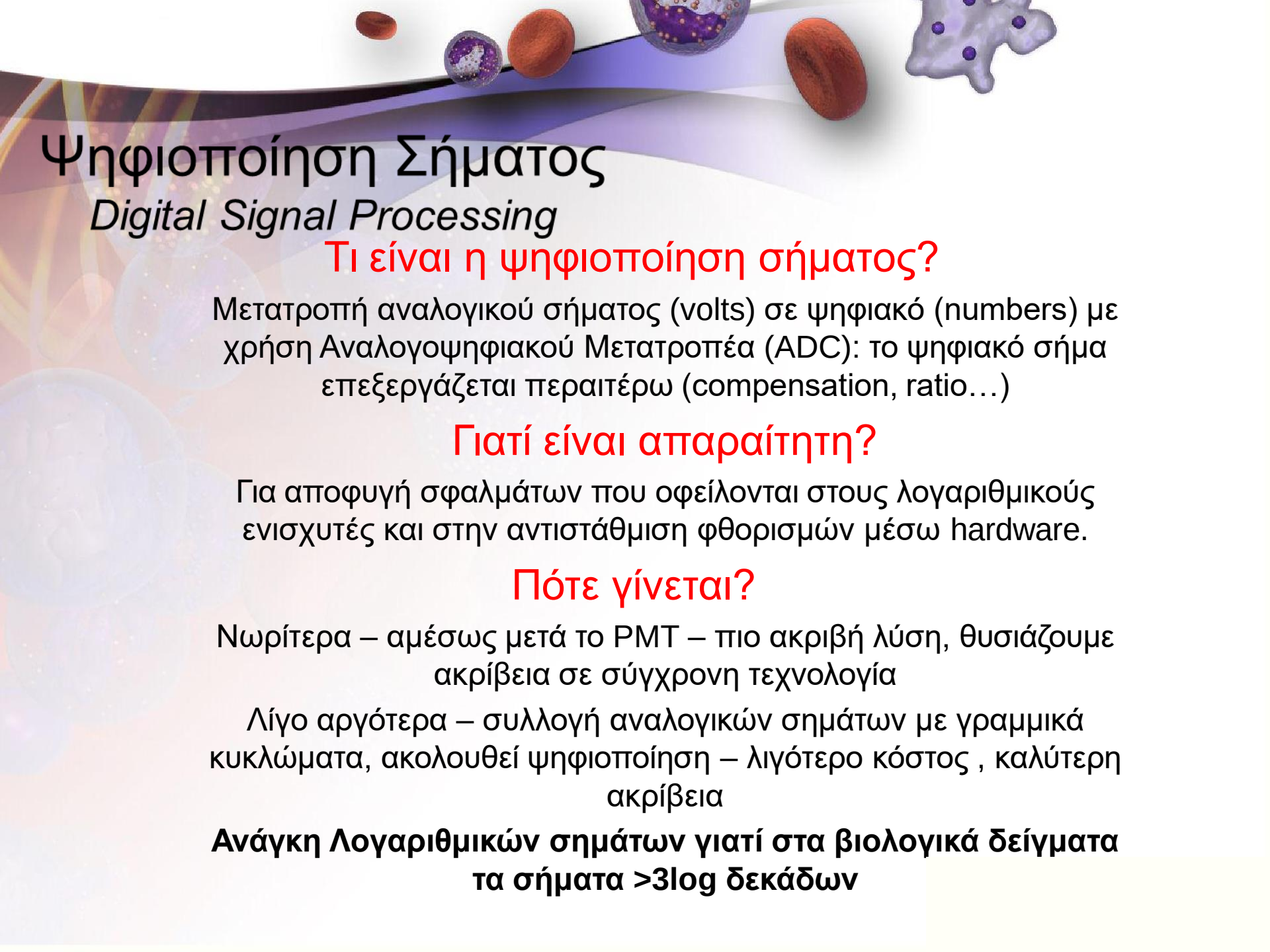
Η πλέον ενδεικνυόμενη Λύση : Ανάστροφος Πίνακας



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?

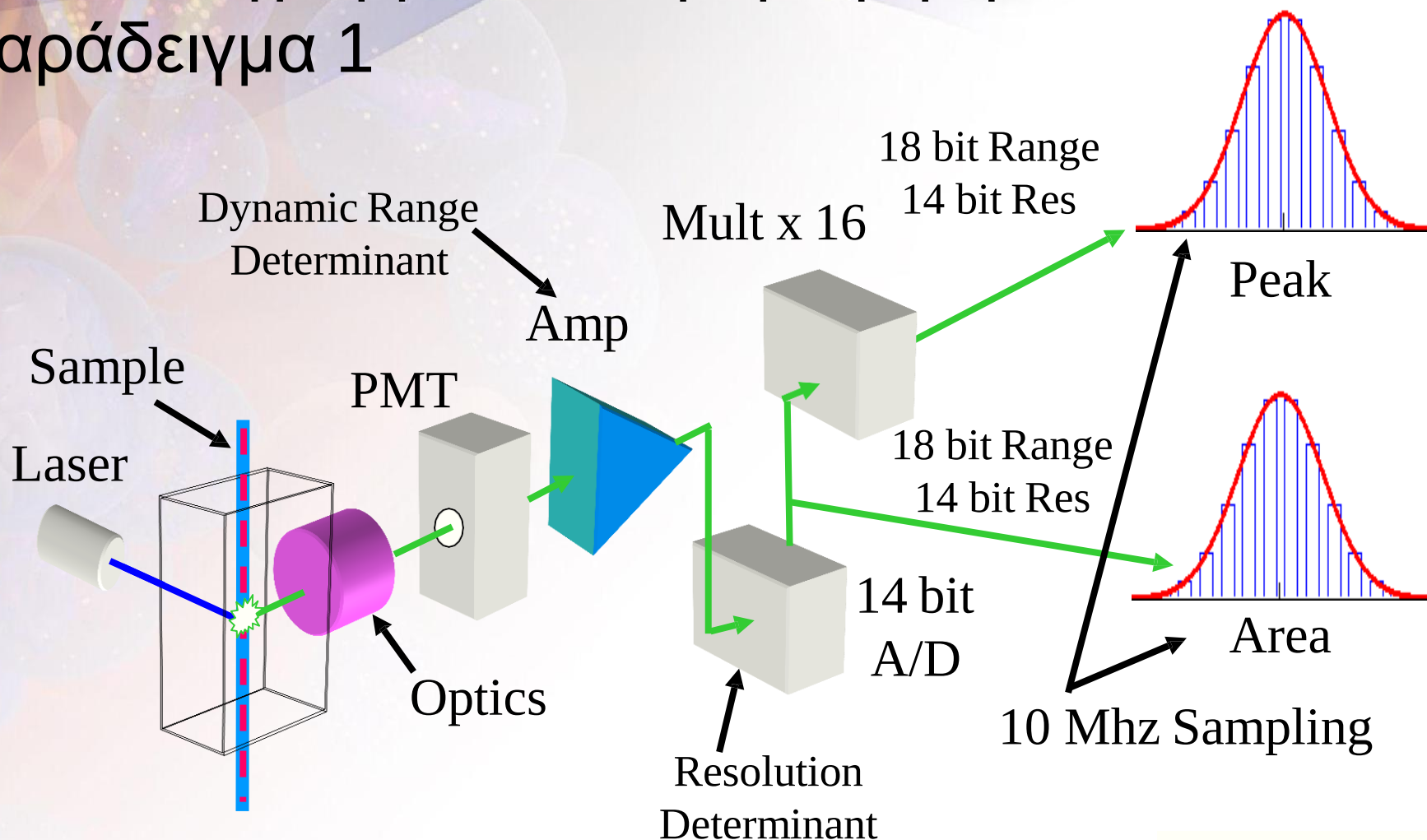
Νωρίτερα – αμέσως μετά το PMT – πιο ακριβή λύση, θυσιάζουμε ακρίβεια σε σύγχρονη τεχνολογία

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

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

Block Διάγραμμα Κυτταρομετρητή

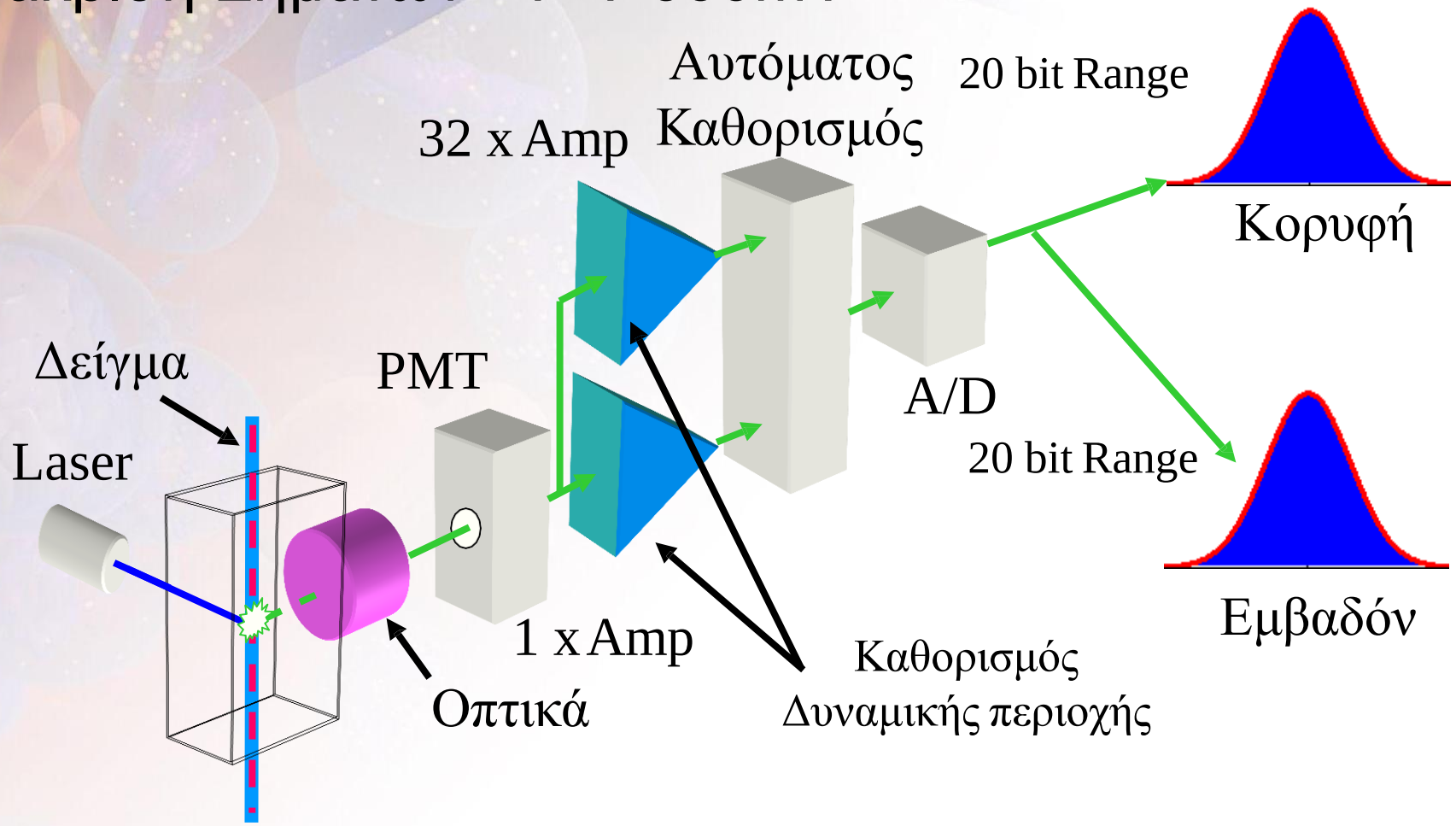
Παράδειγμα 1

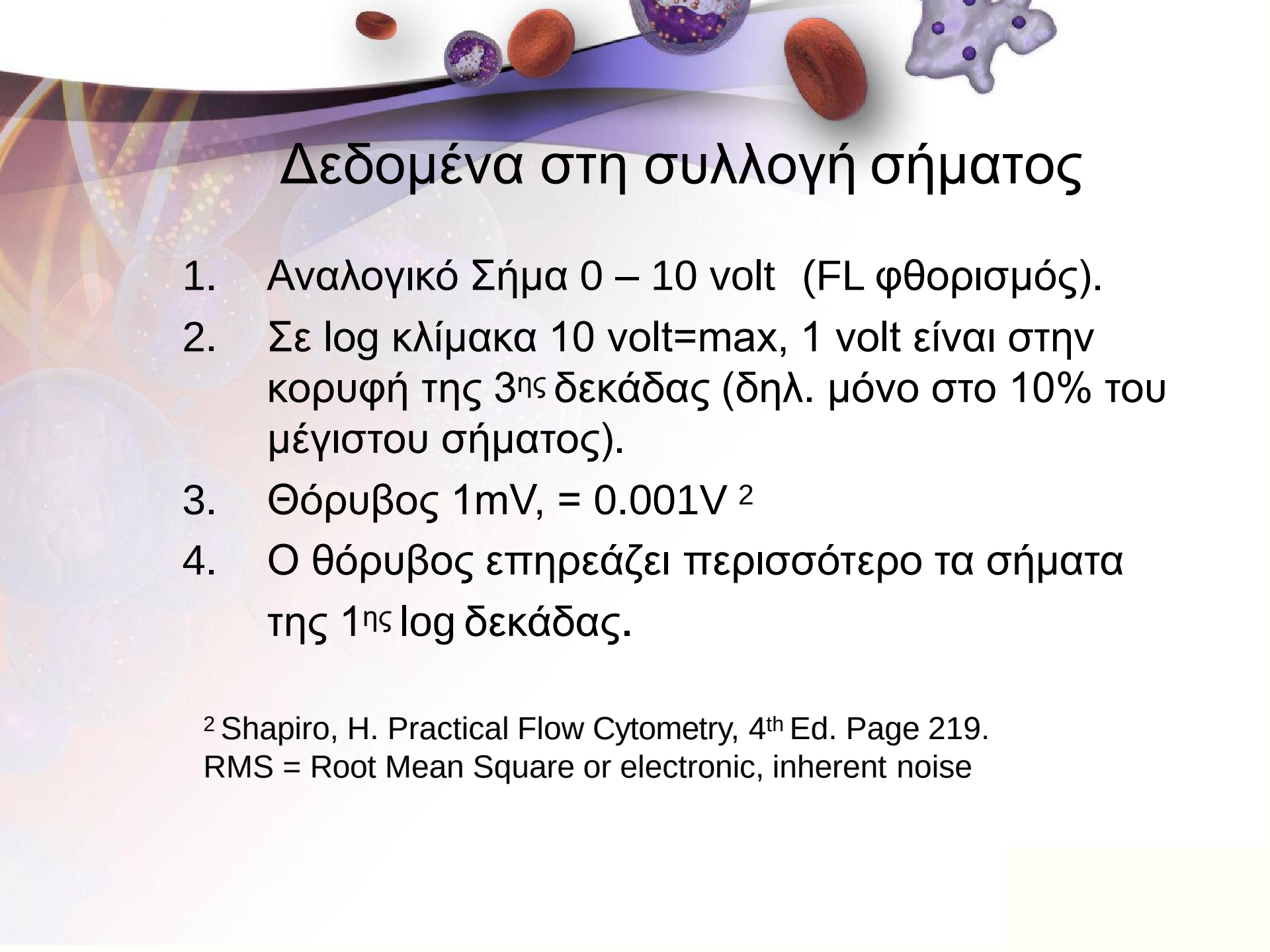


Παράδειγμα 2

Τεχνολογία Beckman Coulter

Διάκριση Σημάτων $>?<? 600\text{mV}$





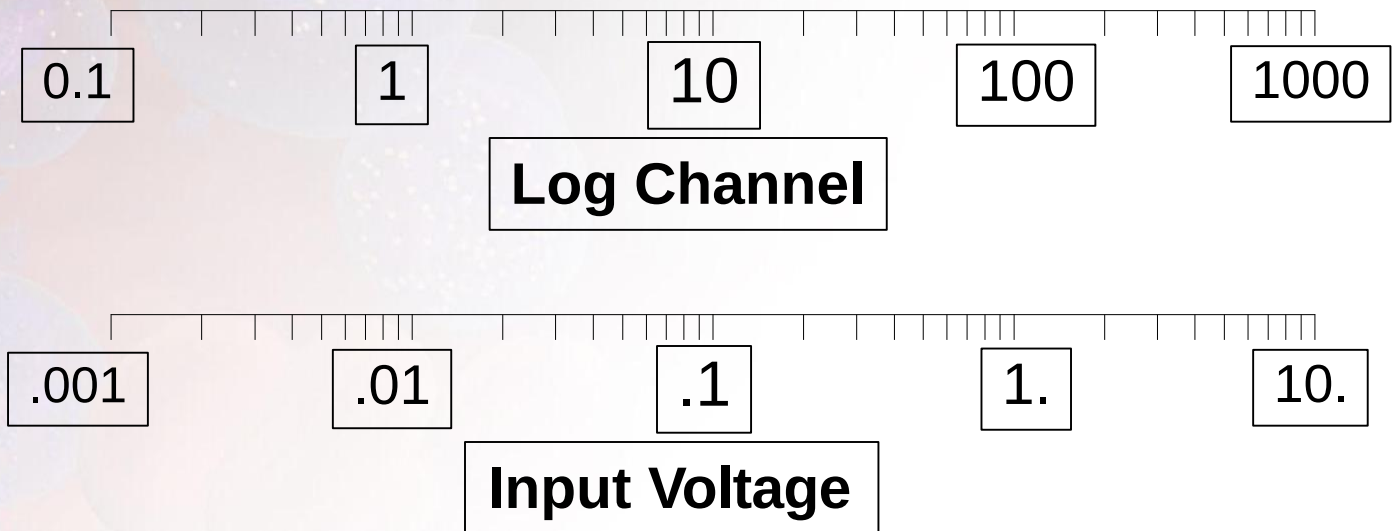
Δεδομένα στη συλλογή σήματος

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

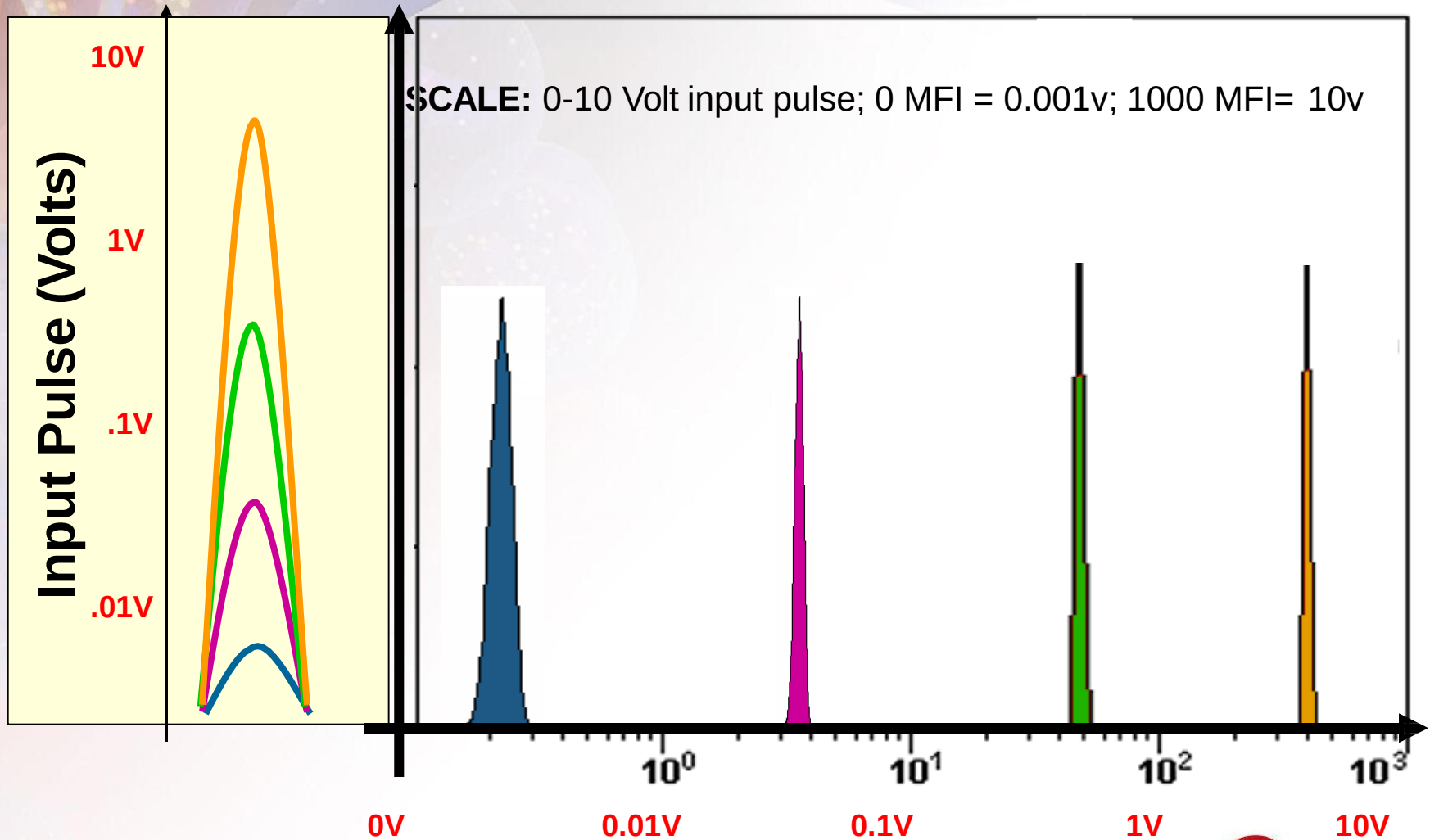
² Shapiro, H. Practical Flow Cytometry, 4th Ed. Page 219.
RMS = Root Mean Square or electronic, inherent noise

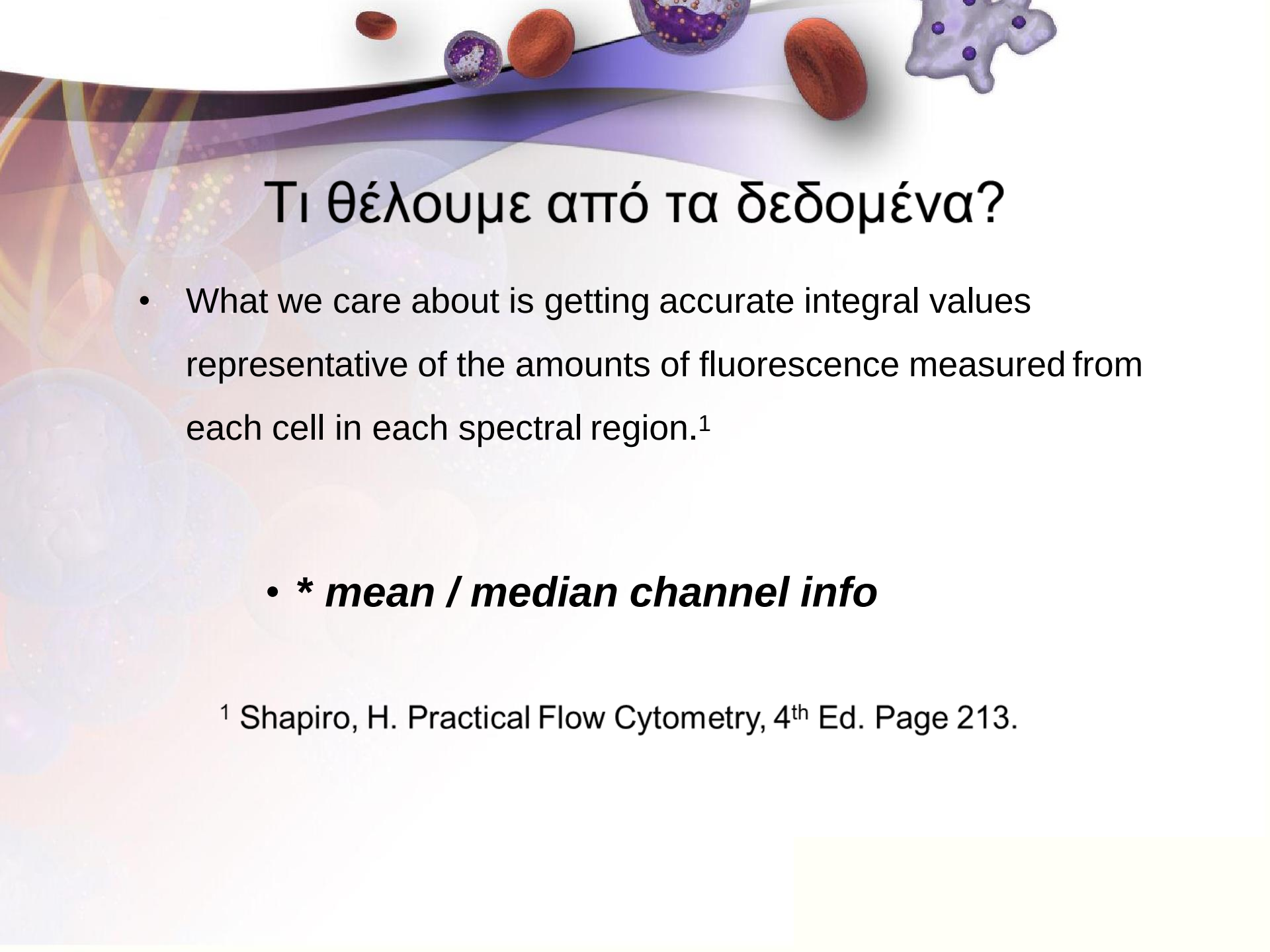


Input Voltage to Log Channel Relationship



Σχέση αναλογικού σήματος με Λογαριθμικό



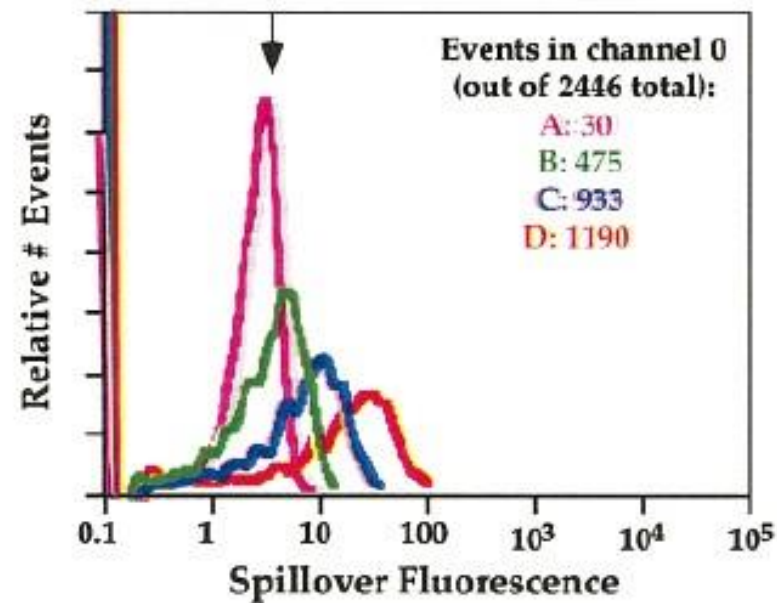
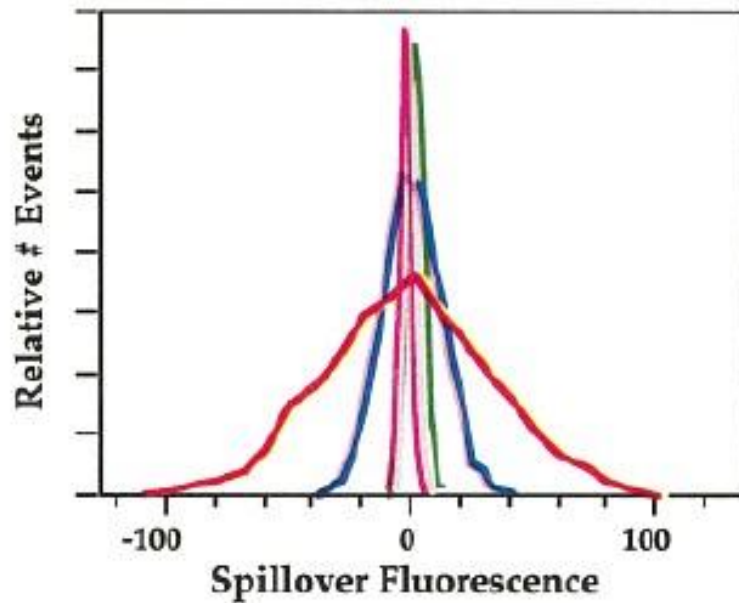
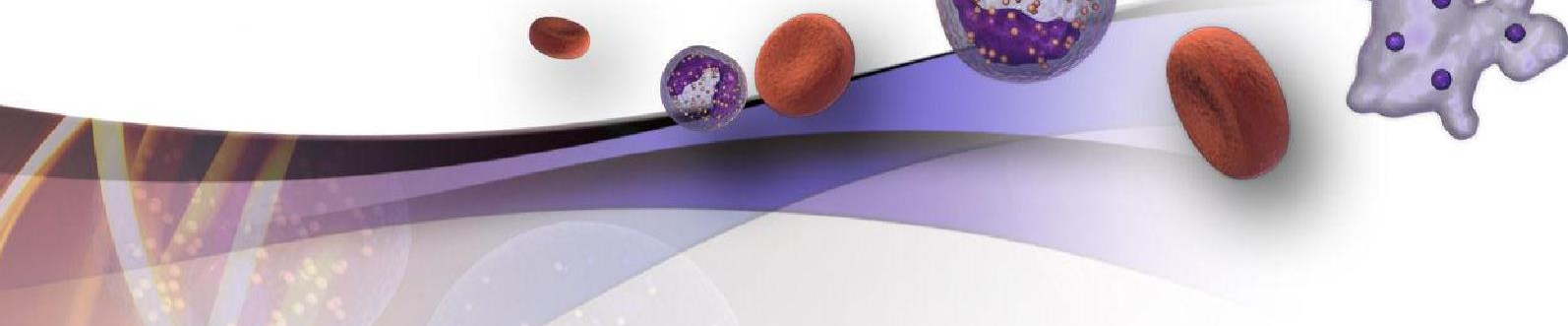


Τι θέλουμε από τα δεδομένα?

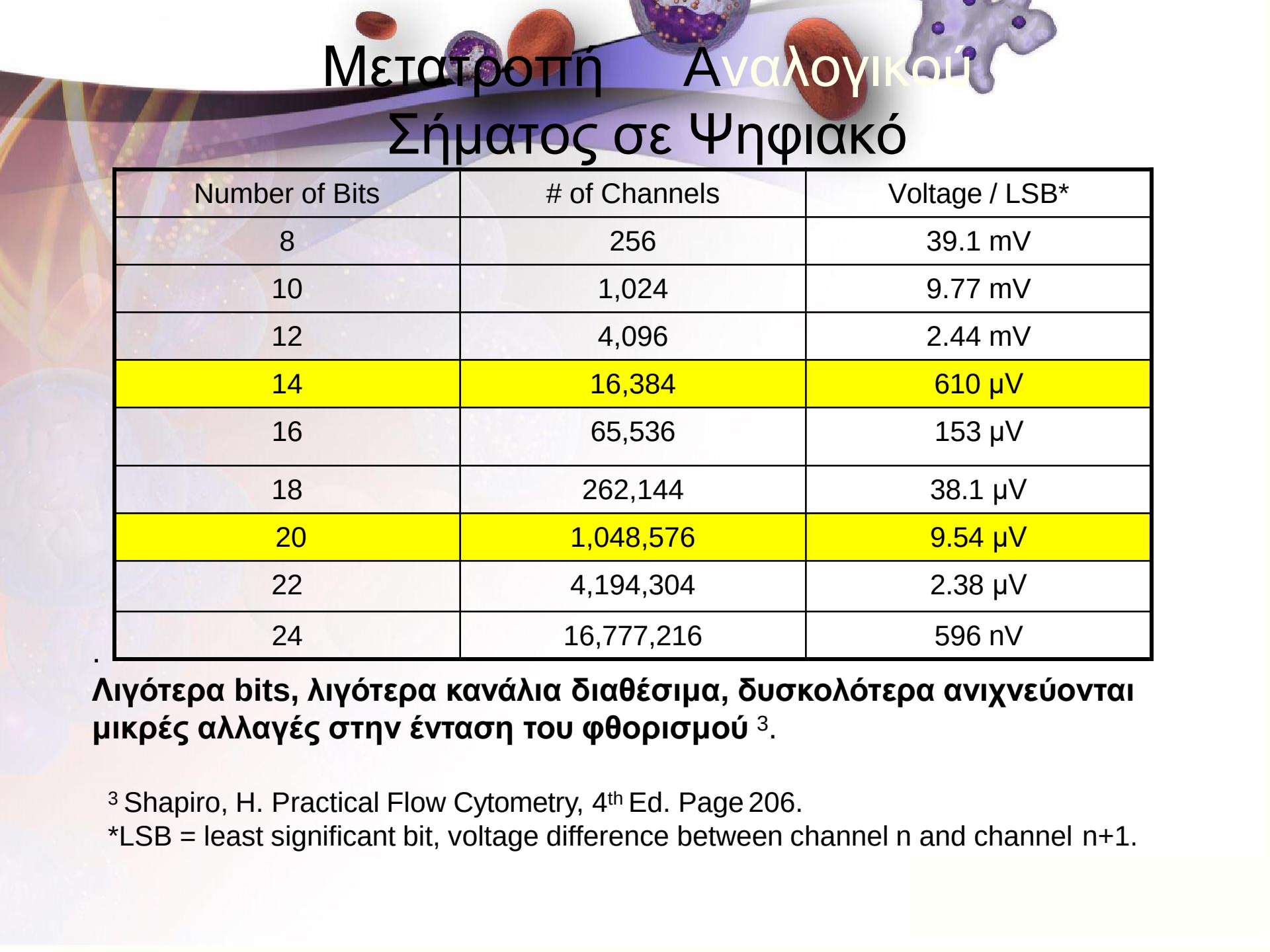
- What we care about is getting accurate integral values representative of the amounts of fluorescence measured from each cell in each spectral region.¹

- *** *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

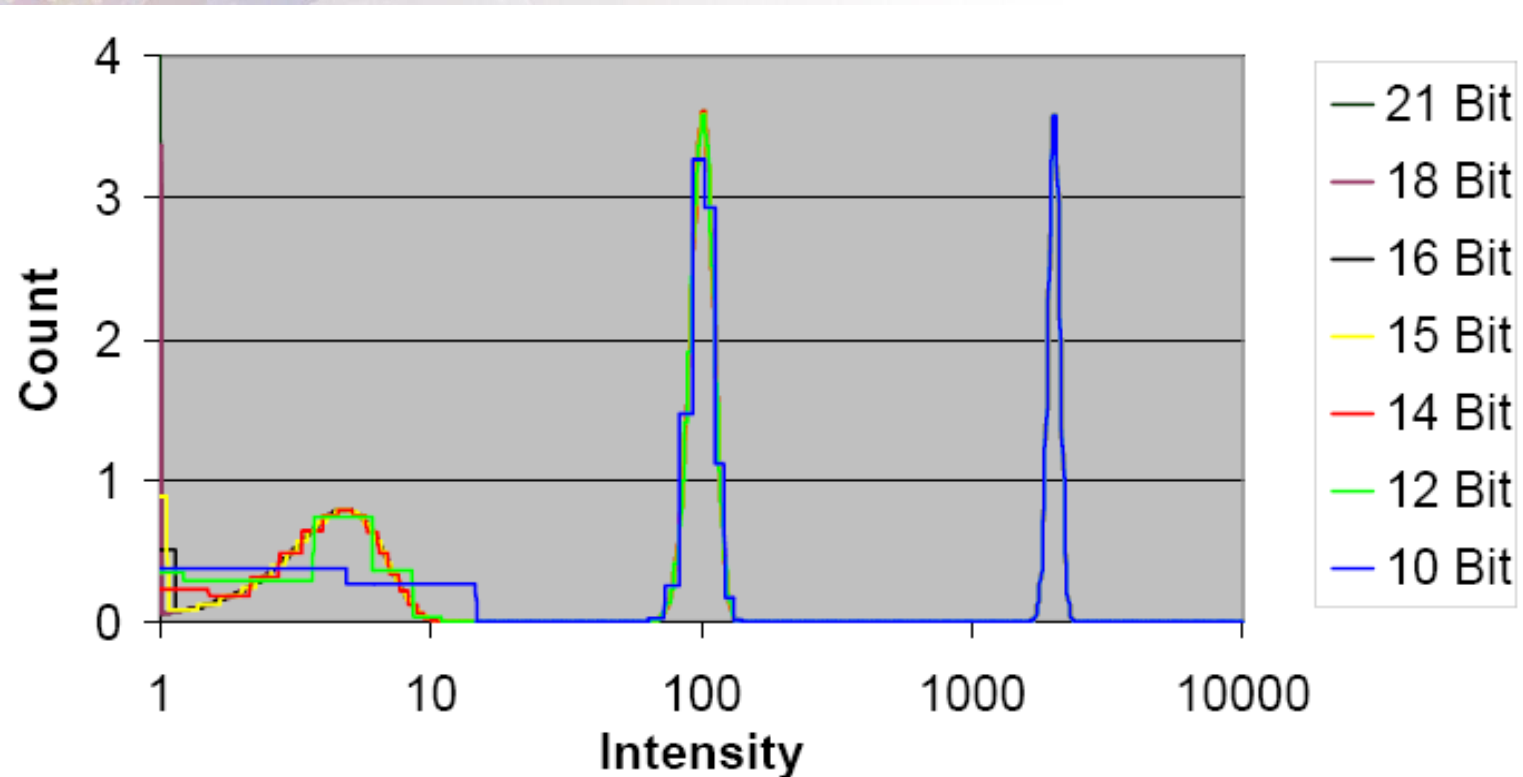
Number of Bits	# of Channels	Voltage / LSB*
8	256	39.1 mV
10	1,024	9.77 mV
12	4,096	2.44 mV
14	16,384	610 μ V
16	65,536	153 μ V
18	262,144	38.1 μ V
20	1,048,576	9.54 μ V
22	4,194,304	2.38 μ V
24	16,777,216	596 nV

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.

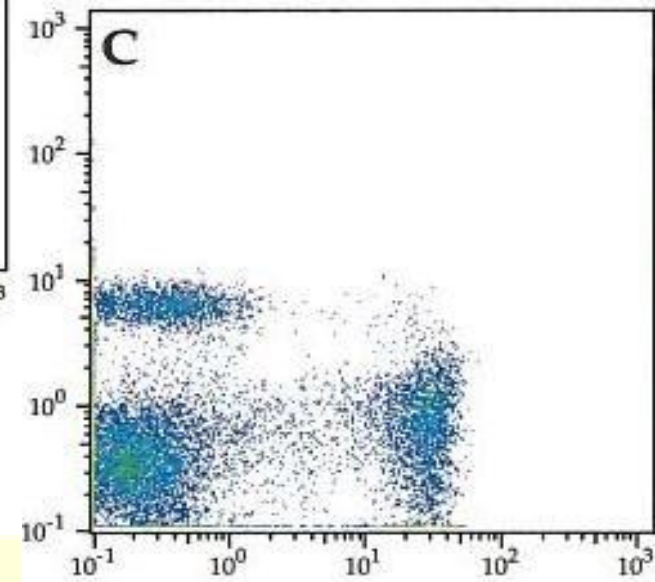
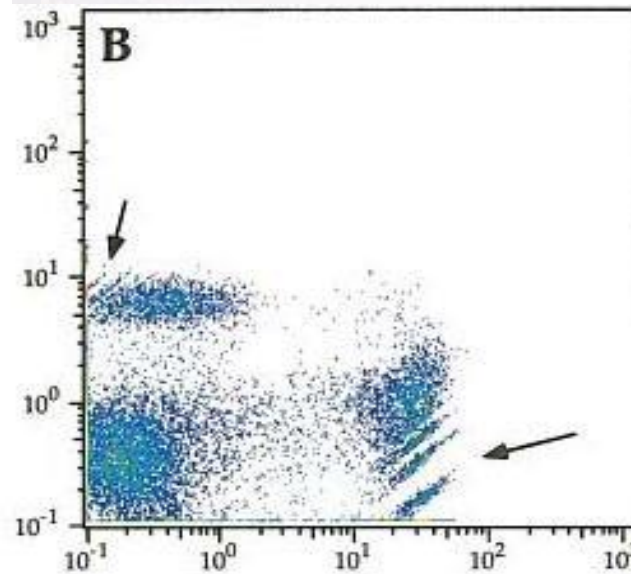
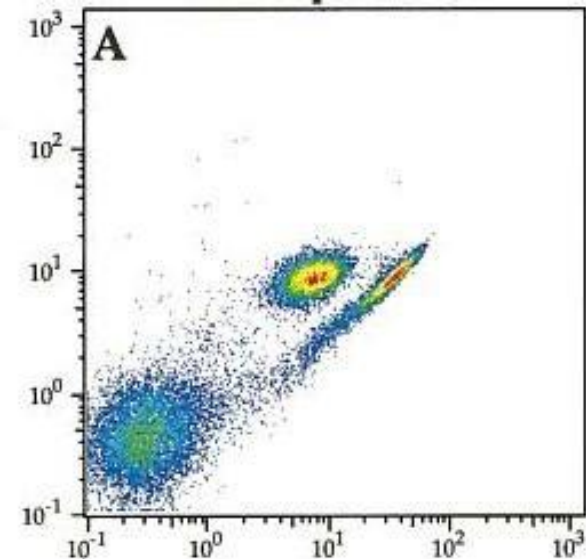
Σύγκριση Σημάτων με βάση την Ανάλυση (Resolution)



Στην 1^η 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

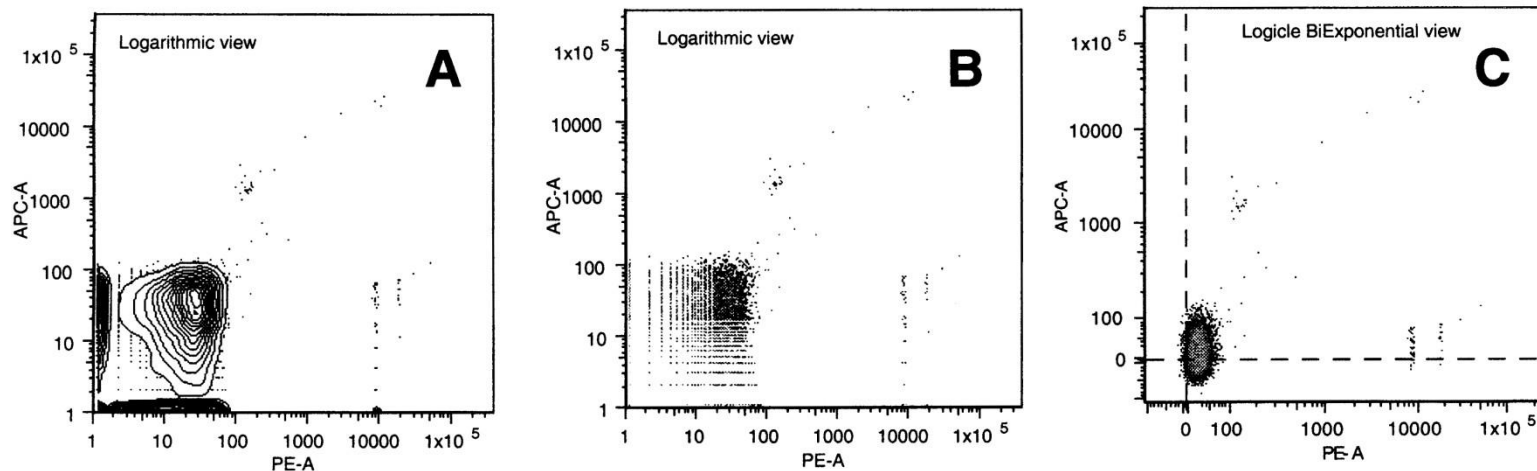
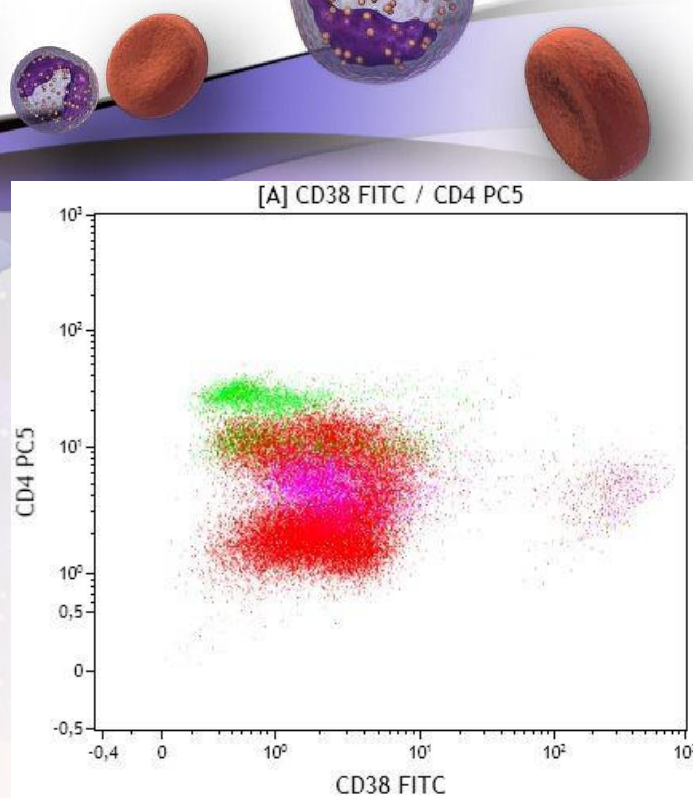
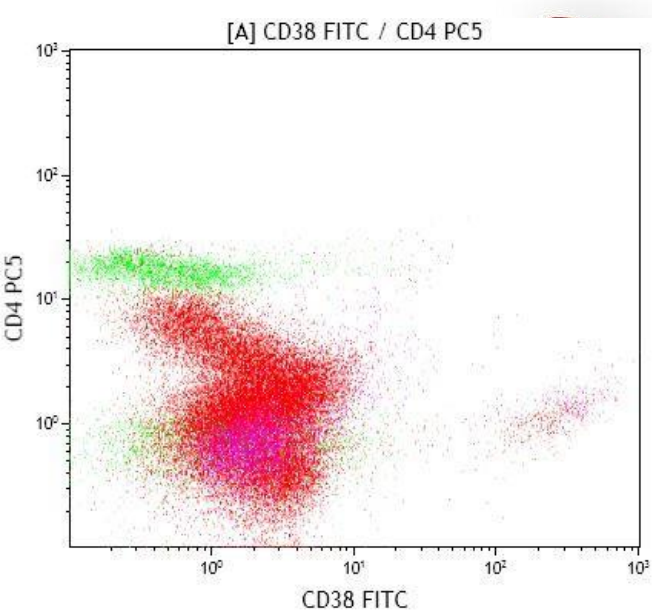
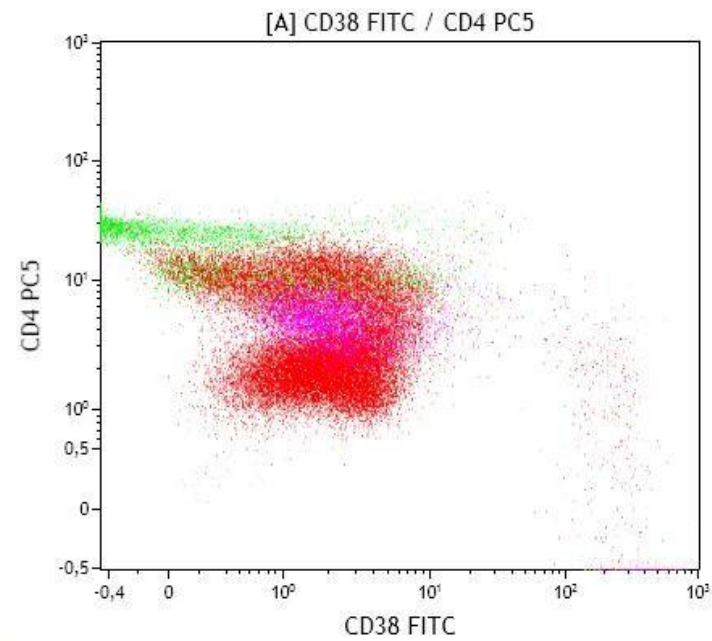
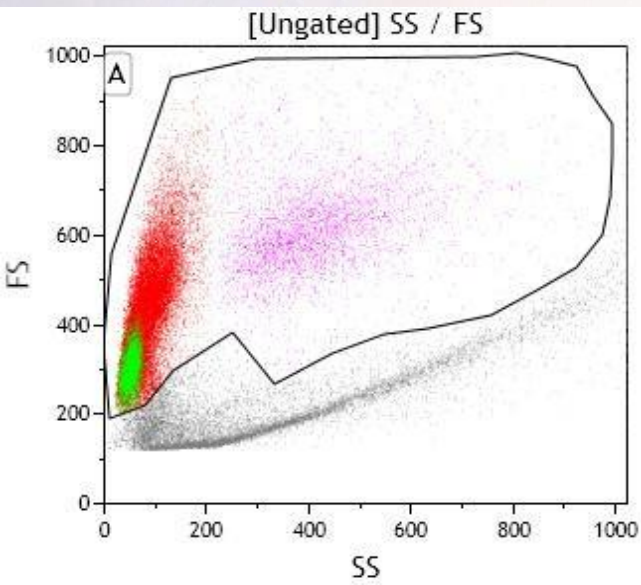


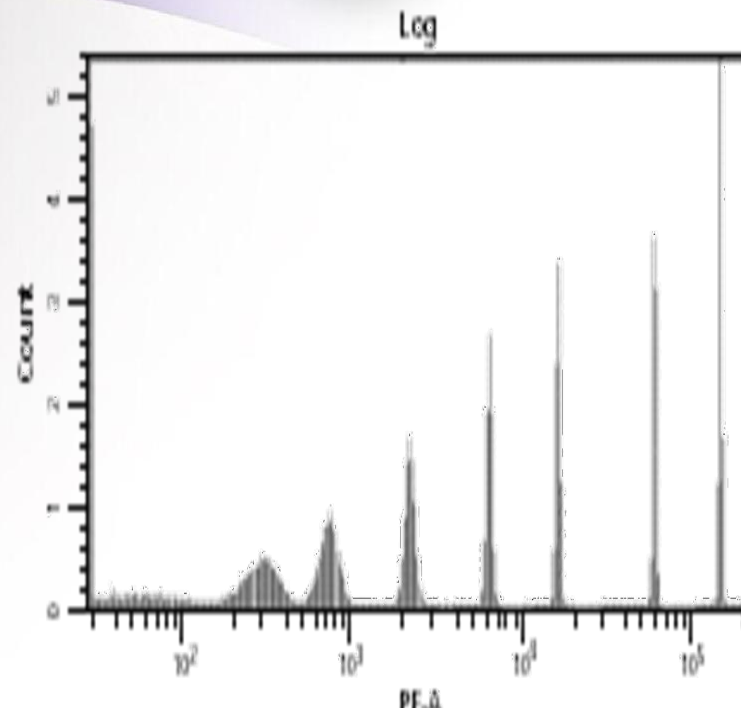
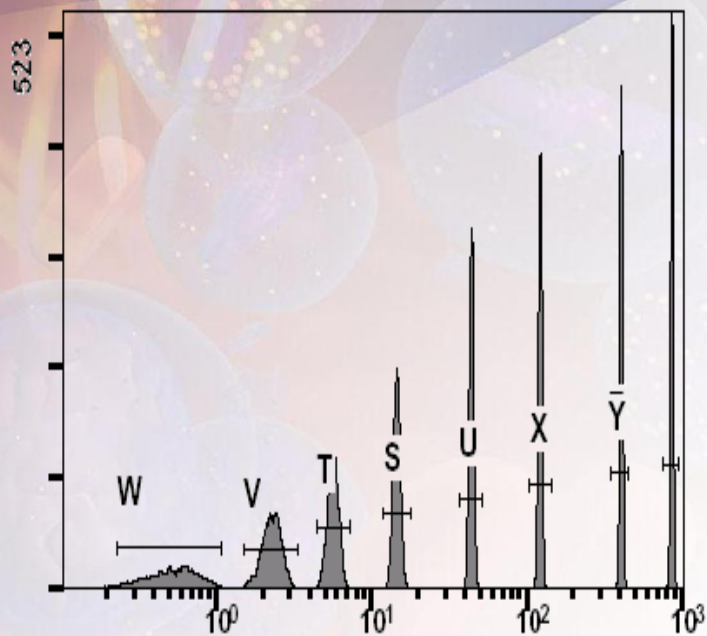
Figure 12-1. Tearing down the “picket fence” and reuniting the negatives using a BiExponential data transform instead of a logarithmic scale. Courtesy of David Parks and Wayne Moore (Herzenberg Lab, Stanford).



Συνδυασμός
Γραμμικής και
Λογαριθμικής
Κλίμακας
Kaluza soft BC



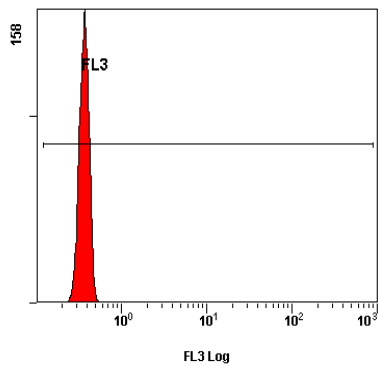
Log Histogram Display



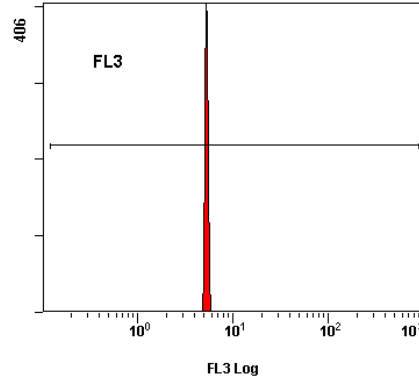
Resolution	20-bit	14-bit
% Σφάλμα	<1.5% 1 ^η δεκάδα <1% 2-4 ^η δεκάδα	<50% 1 ^η δεκάδα <7.5% 2 ^η δεκάδα <1.0% 3-4 ^η δεκάδα
Δυναμική Περιοχή	4 δεκάδες	~2 δεκάδες

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

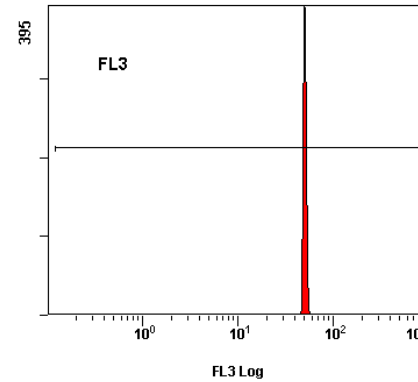
250 Volts



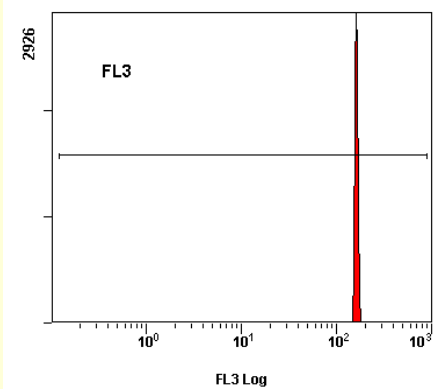
400 Volts



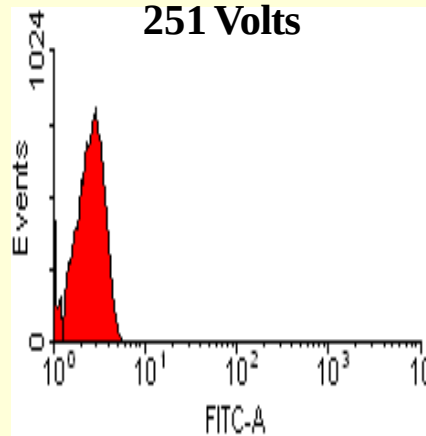
500 Volts



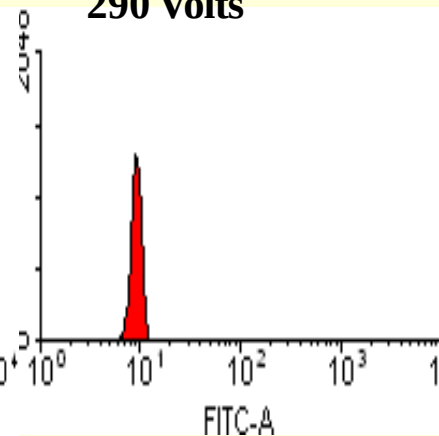
650 Volts



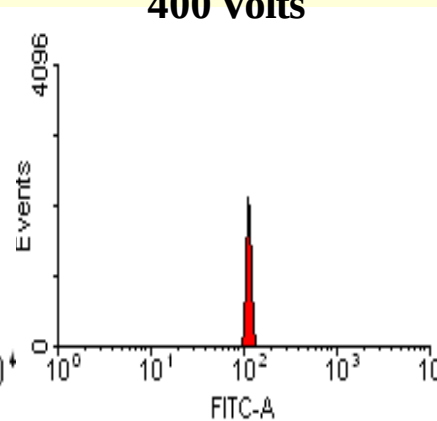
251 Volts



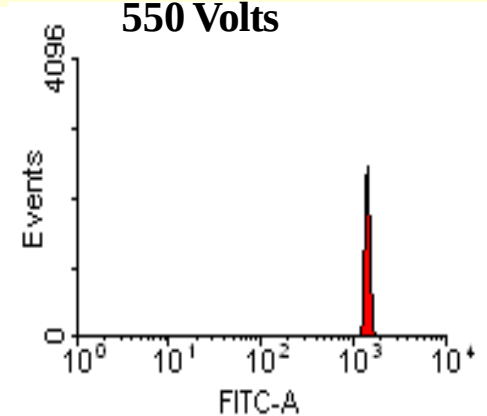
290 Volts



400 Volts



550 Volts

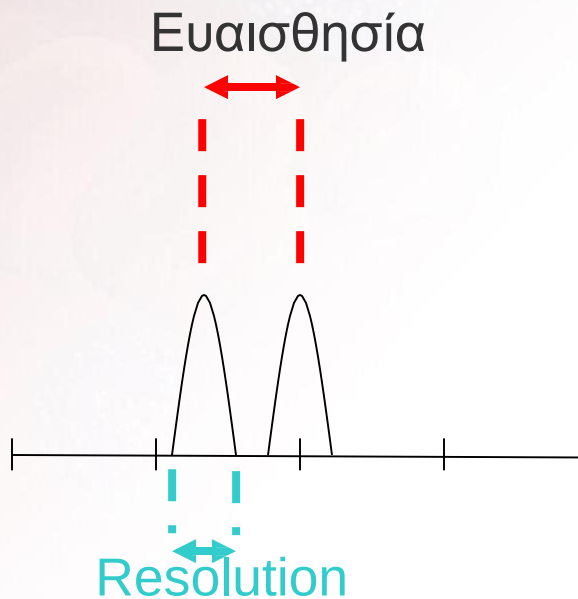


Flow Set Beads

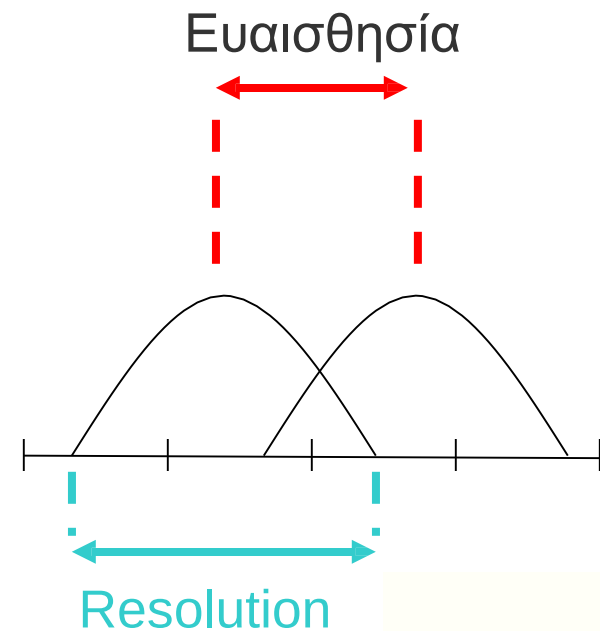
Resolution vs. Sensitivity

Resolution : Μεγάλη επίδραση στη διάκριση των πληθυσμών

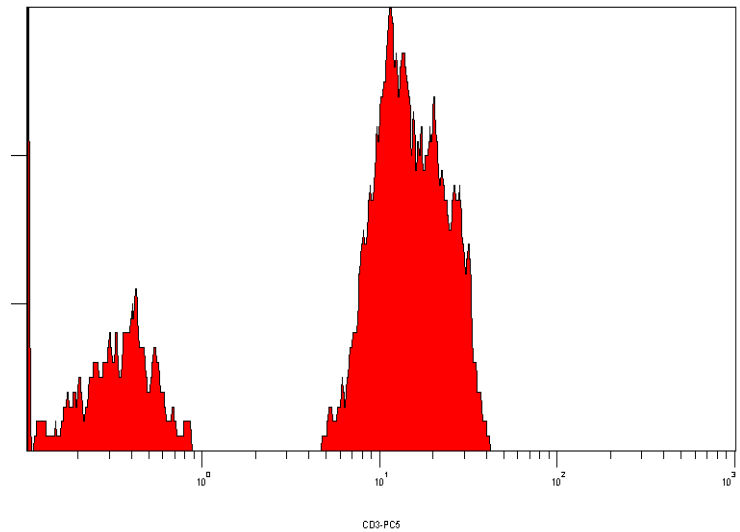
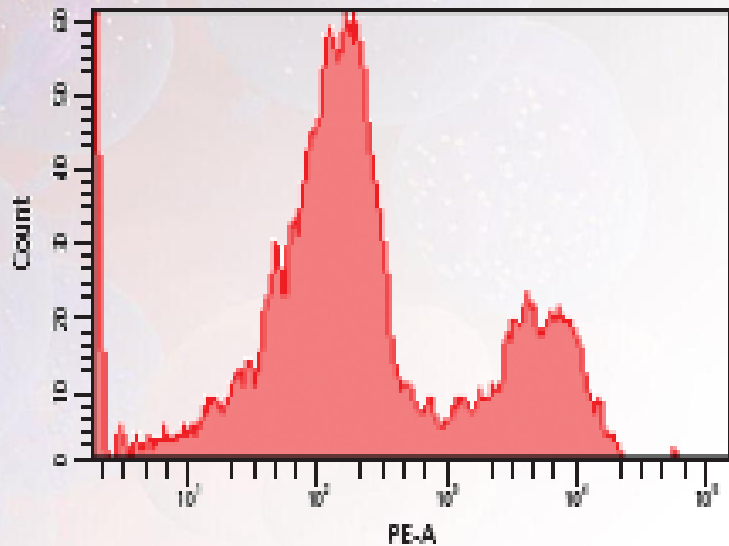
Μικρότερη Ευαισθησία,
καλύτερο resolution



Καλύτερη Ευαισθησία,
χειρότερο resolution

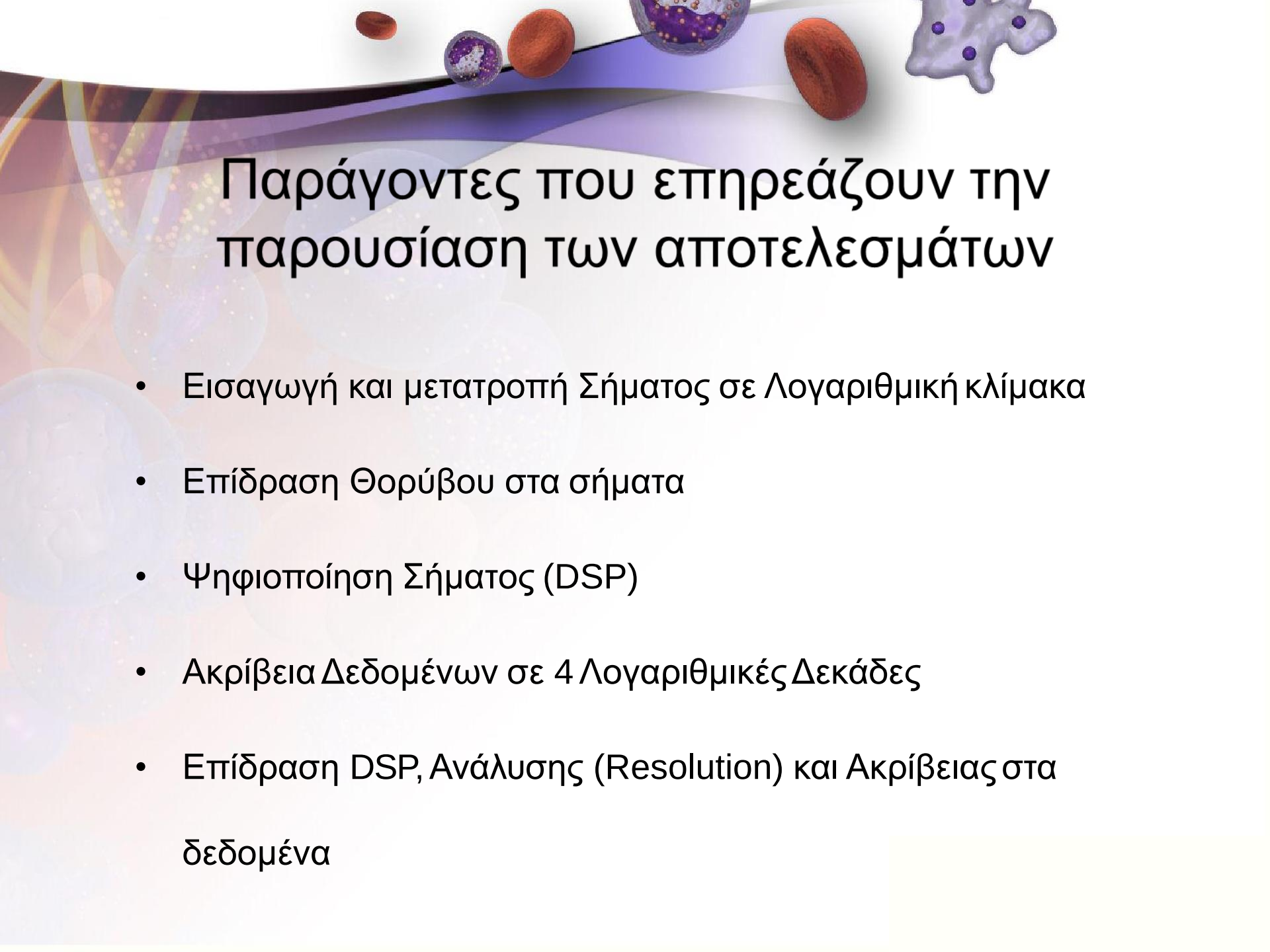


Εύρεση παθητικού φθορισμού



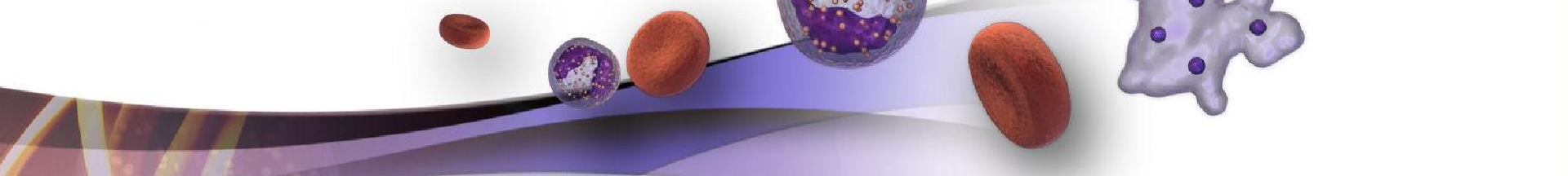
Ποια είναι η διαθέσιμη δυναμική περιοχή στη log κλίμακα?

Υπάρχει shift στο φθορισμό μεγαλύτερο από 2 δεκάδες?



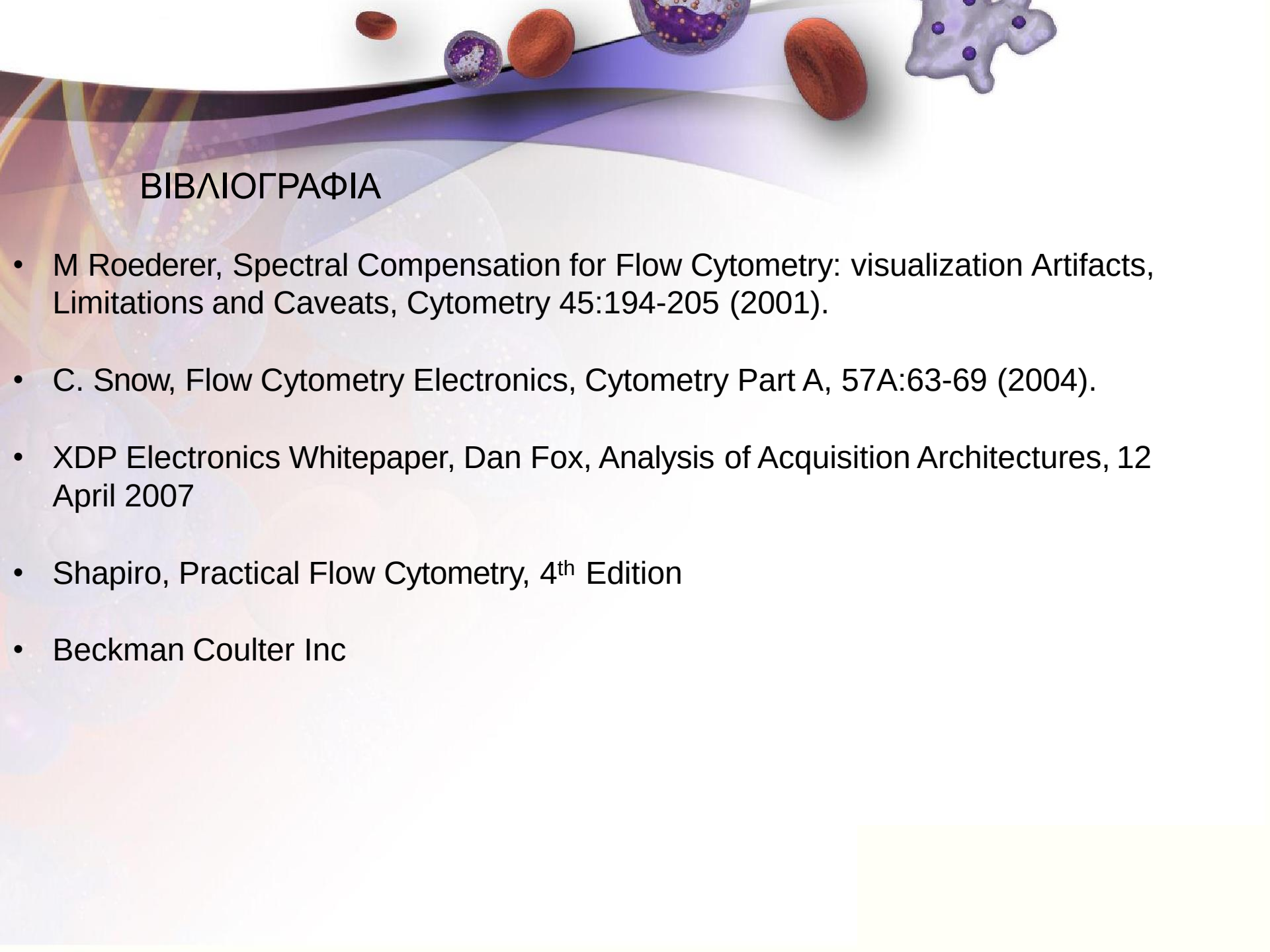
Παράγοντες που επηρεάζουν την παρουσίαση των αποτελεσμάτων

- 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

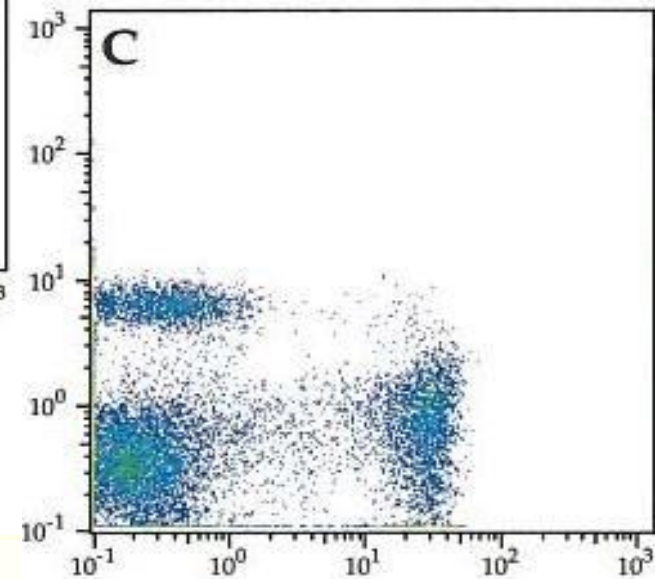
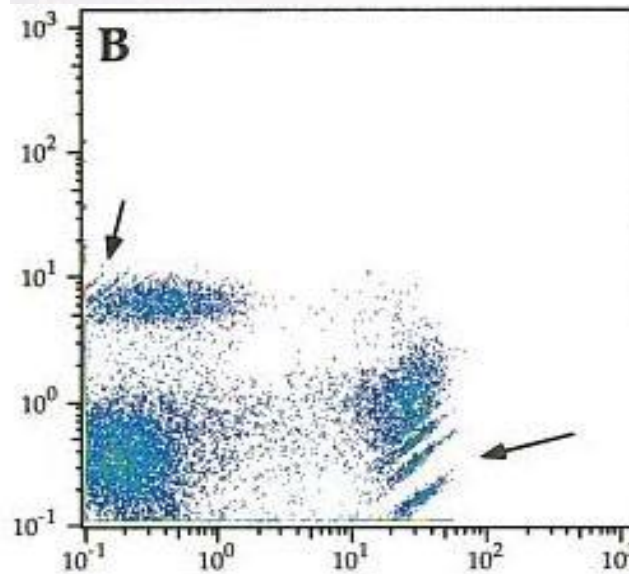
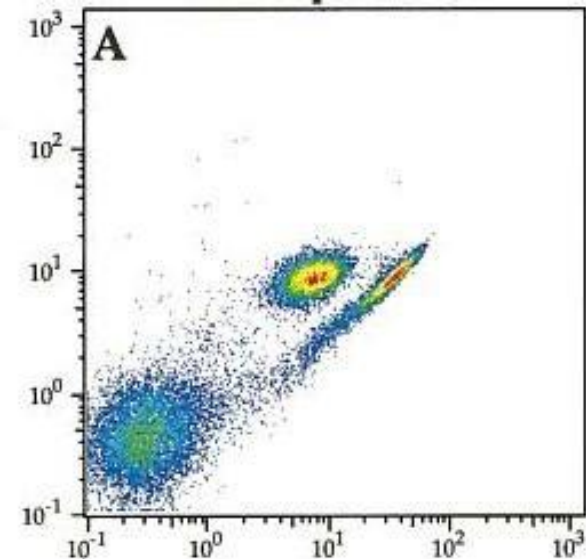
- **Υψηλότερο resolution** Απουσία «κενών» (picket fencing) στα ιστογράμματα
- **Εξαιρετική ακρίβεια** (<1.5% σφάλμα) σε 4 log δεκάδες
- **Εξαιρετική δυναμική Περιοχή:**
 - 3+ log δεκάδες για αξιοποίηση σημάτων



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

Αντιστάθμιση Φθορισμών (Compensation)



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