

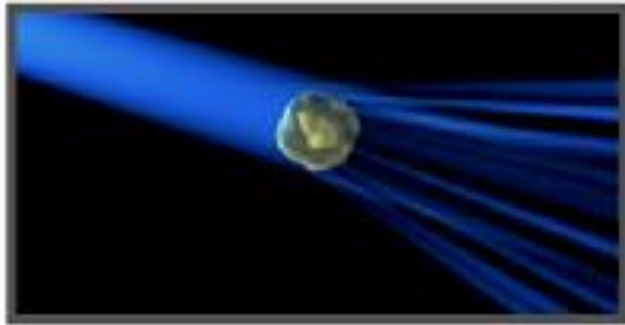
Ανάλυση δεδομένων και ερμηνεία Κυτταρομετρικά δεδομένα και απεικόνιση

Απεικόνιση δεδομένων

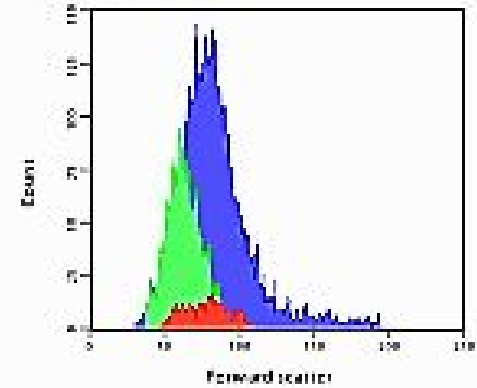
Δημητρακοπούλου Λίλα

Επιμ.Α Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, Γ.Ν.Α. «Λαϊκό»

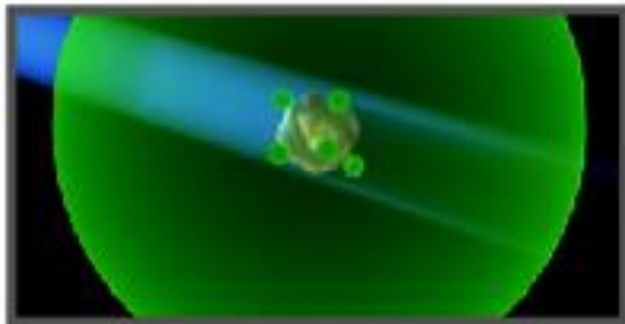
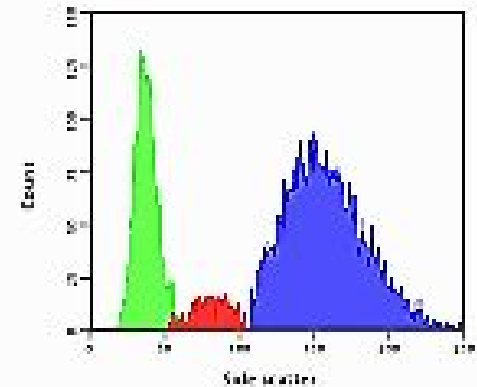
Παρουσίαση των δεδομένων



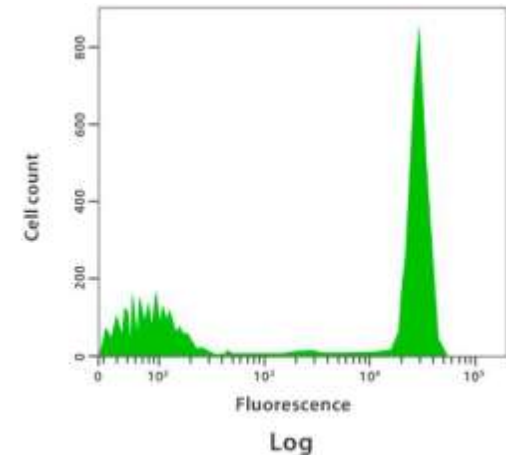
Forward scatter



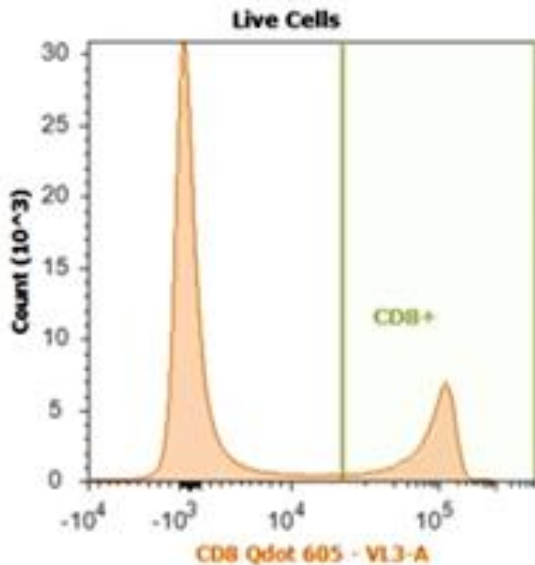
Side scatter



Fluorescence



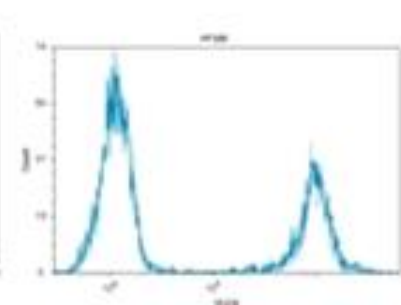
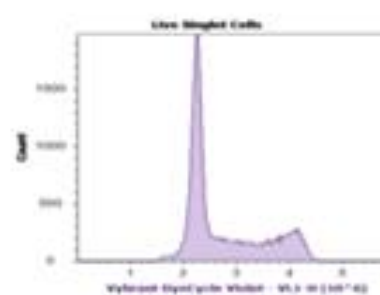
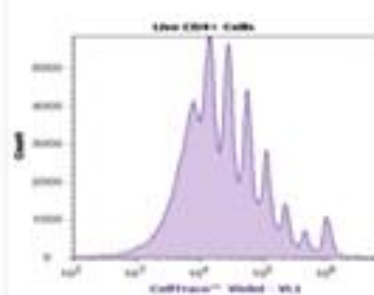
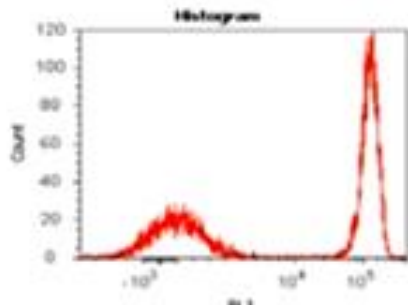
ΙΣΤΟΓΡΑΜΜΑ Α



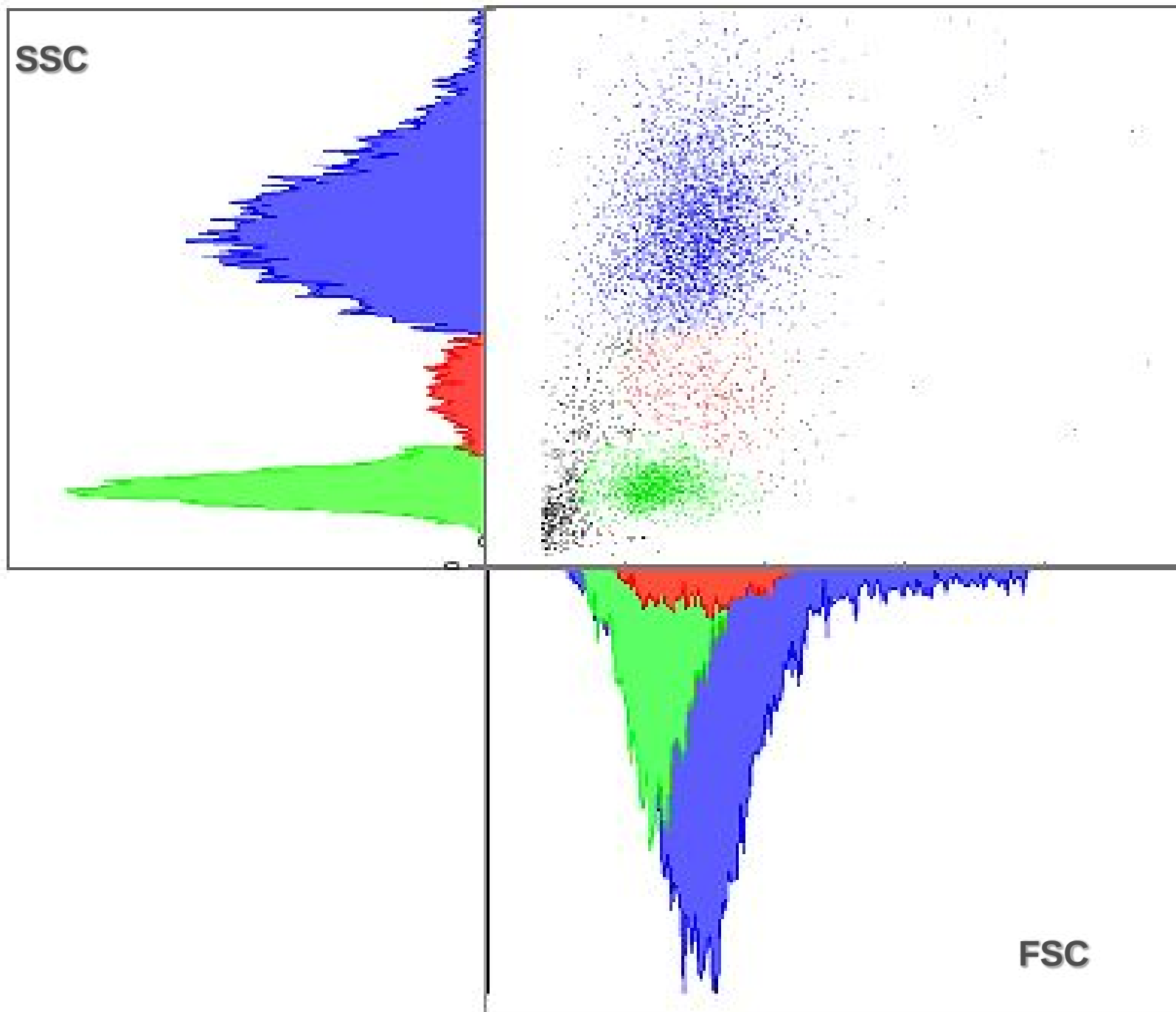
Το ιστόγραμμα απεικονίζει την κατανομή των γεγονότων (events) μίας παραμέτρου.

Ο οριζόντιος άξονας (x) αντιστοιχεί στην ένταση του σήματος ενώ ο κάθετος άξονας (y) αντιστοιχεί στον αριθμό των events (κυττάρων)

Δεν δείχνει τις συσχετίσεις με άλλες παραμέτρους

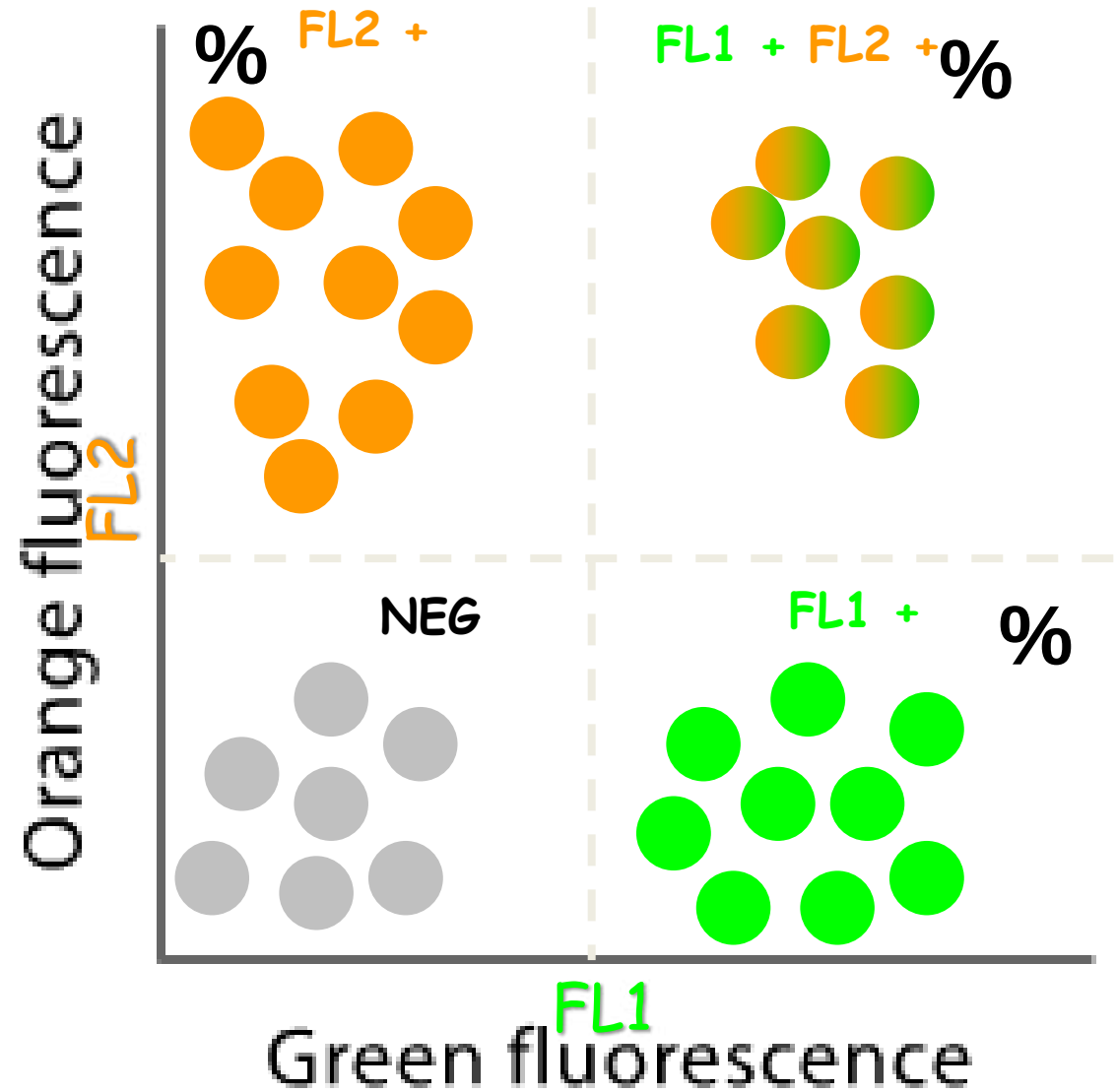
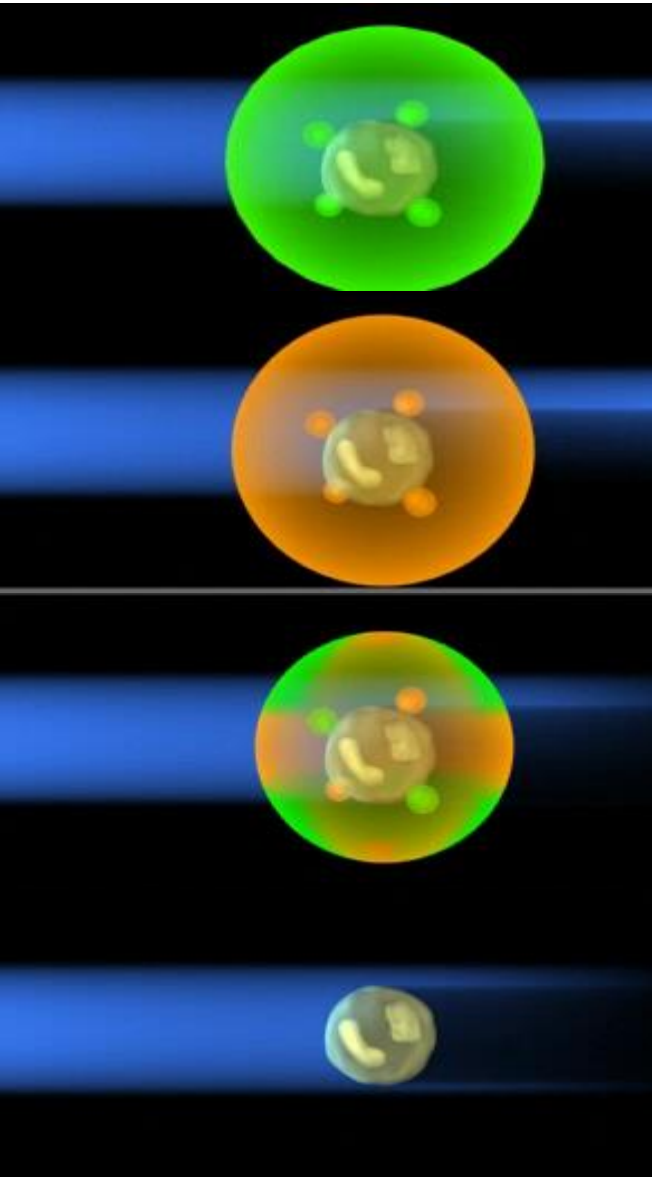


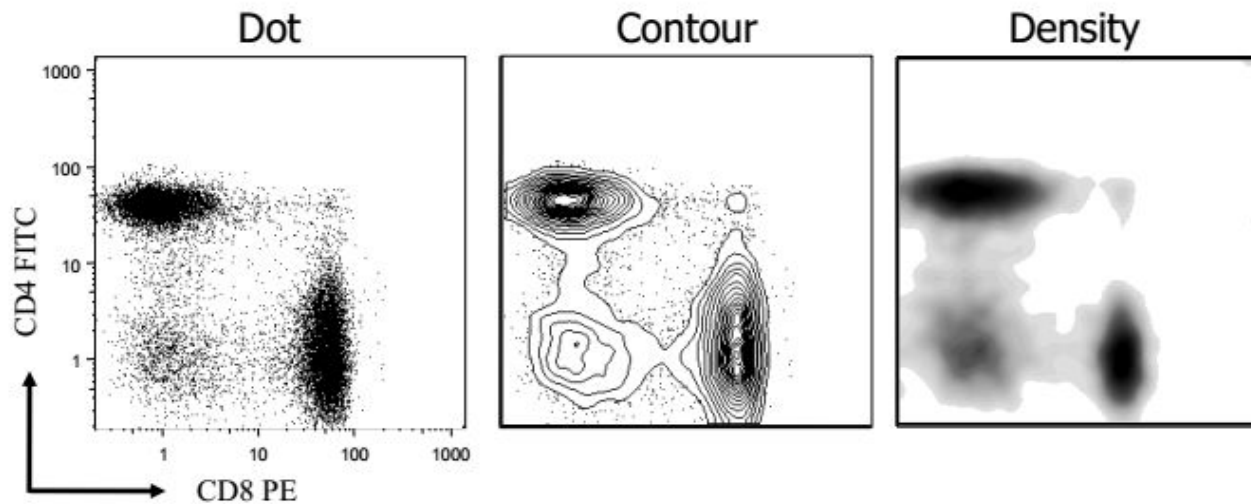
SSC



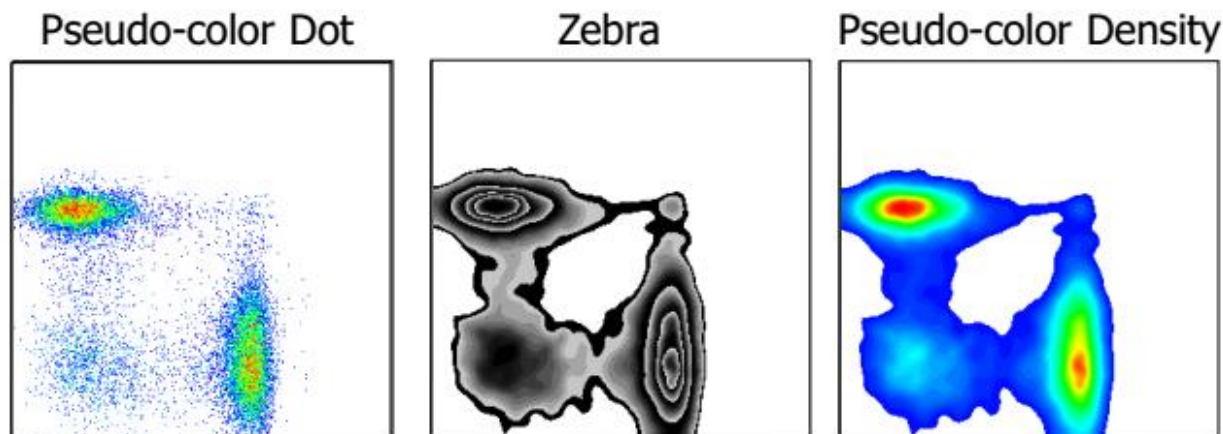
FSC

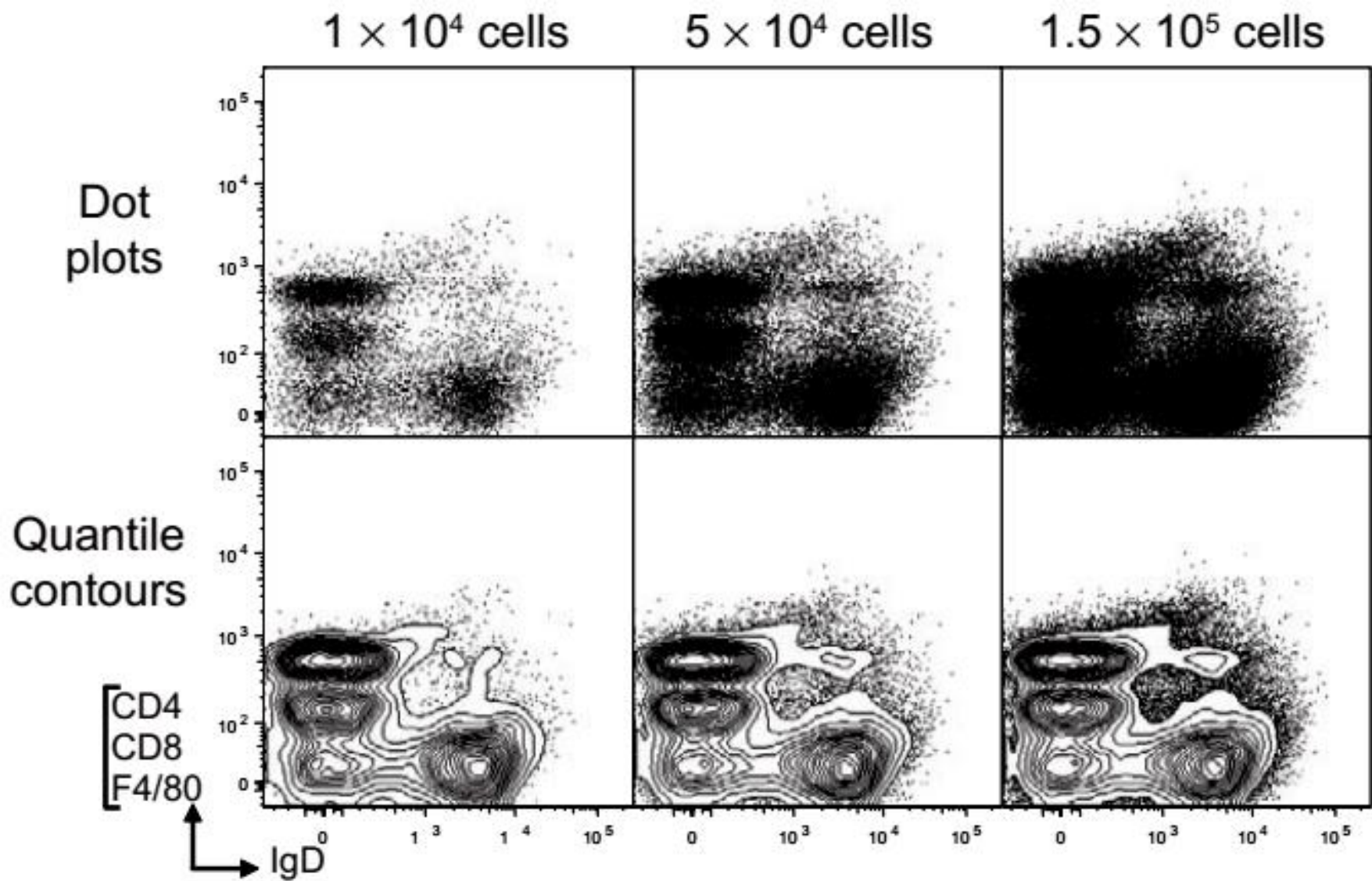
Dot plot-στικτόγραμμα





- Το στικτόγραμμα (dot plot) απεικονίζει τα δεδομένα από δύο παραμέτρους ταυτόχρονα καθώς και τις συσχετίσεις μεταξύ τους.
Κάθε κουκίδα (dot) αντιστοιχεί σε ένα event (κύτταρο).
Δεν δίνει πληροφορίες για την σχετική πυκνότητα των events.
- Contour plot - Density plot : Απεικονίζουν 2 παραμέτρους σαν κατανομές συχνοτήτων.
Το χρώμα χρησιμοποιείται για να ξεχωρίσουν οι συχνότητες των events

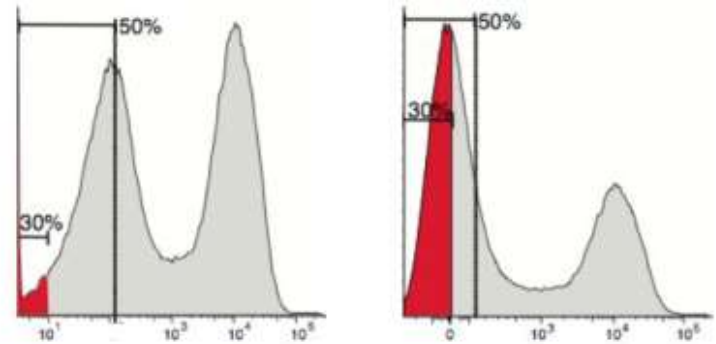
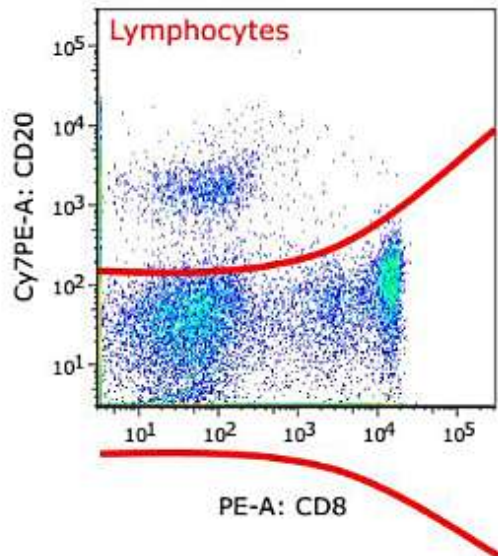




Σε ανάλυση μεγάλου αριθμού κυττάρων είναι καλύτερη ή απεικόνιση σε density / contour plots γιατί στα dot plots δεν διαχωρίζονται καλά οι πληθυσμοί.

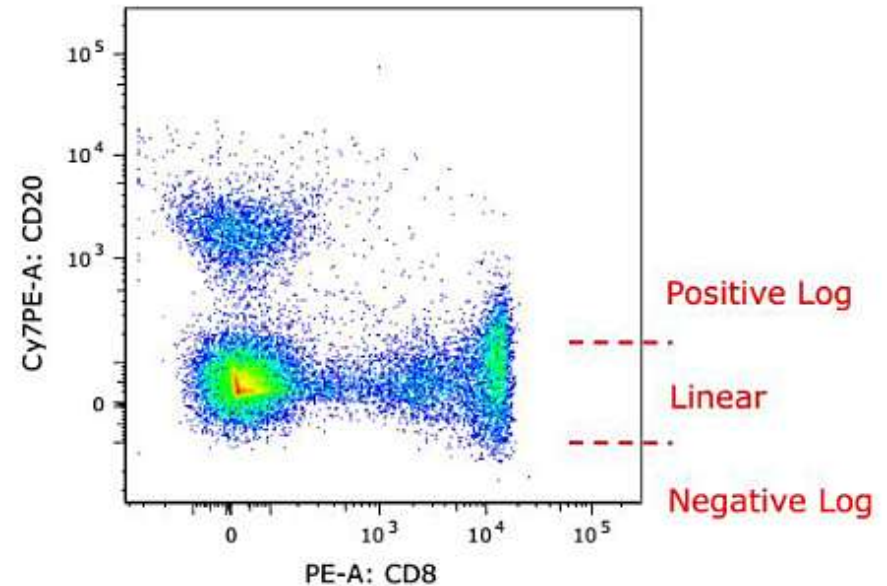
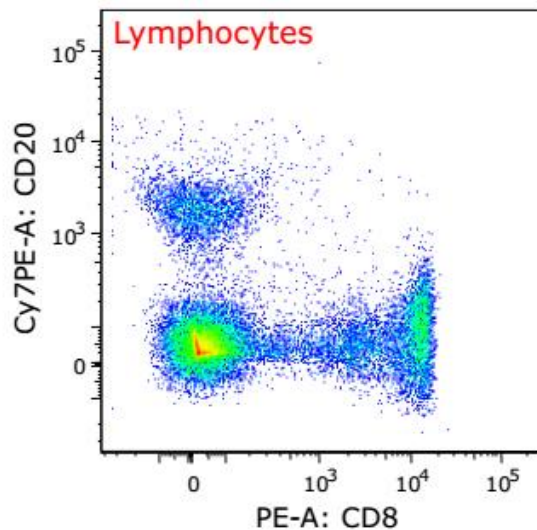
Biexponential Transformation

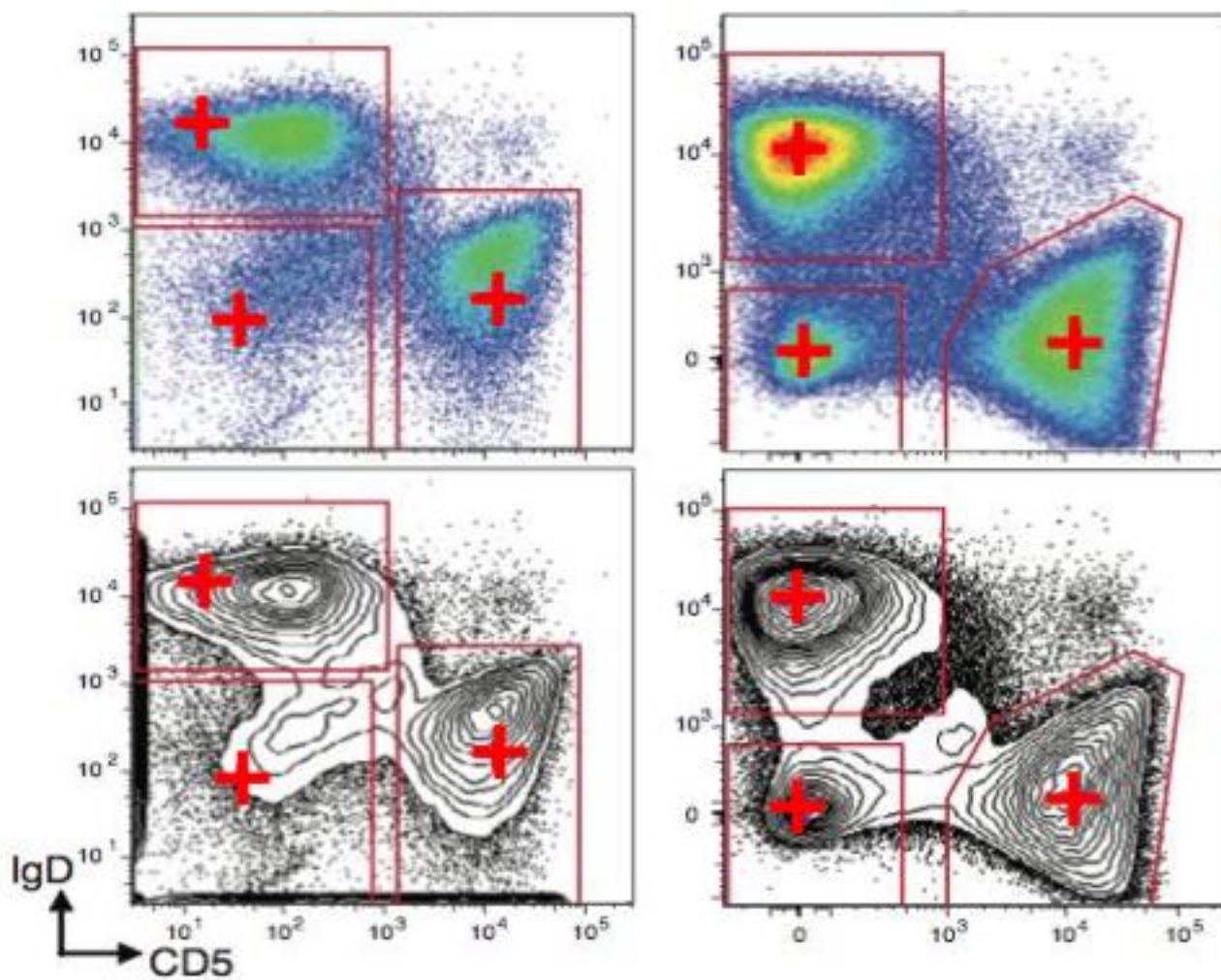
The Actual Spread



Baseline subtractions or compensation result in NEGATIVE values
Transformation "EXPANDS" log scale for lows and negatives
Data values are NOT altered – only the scale is altered

New Display



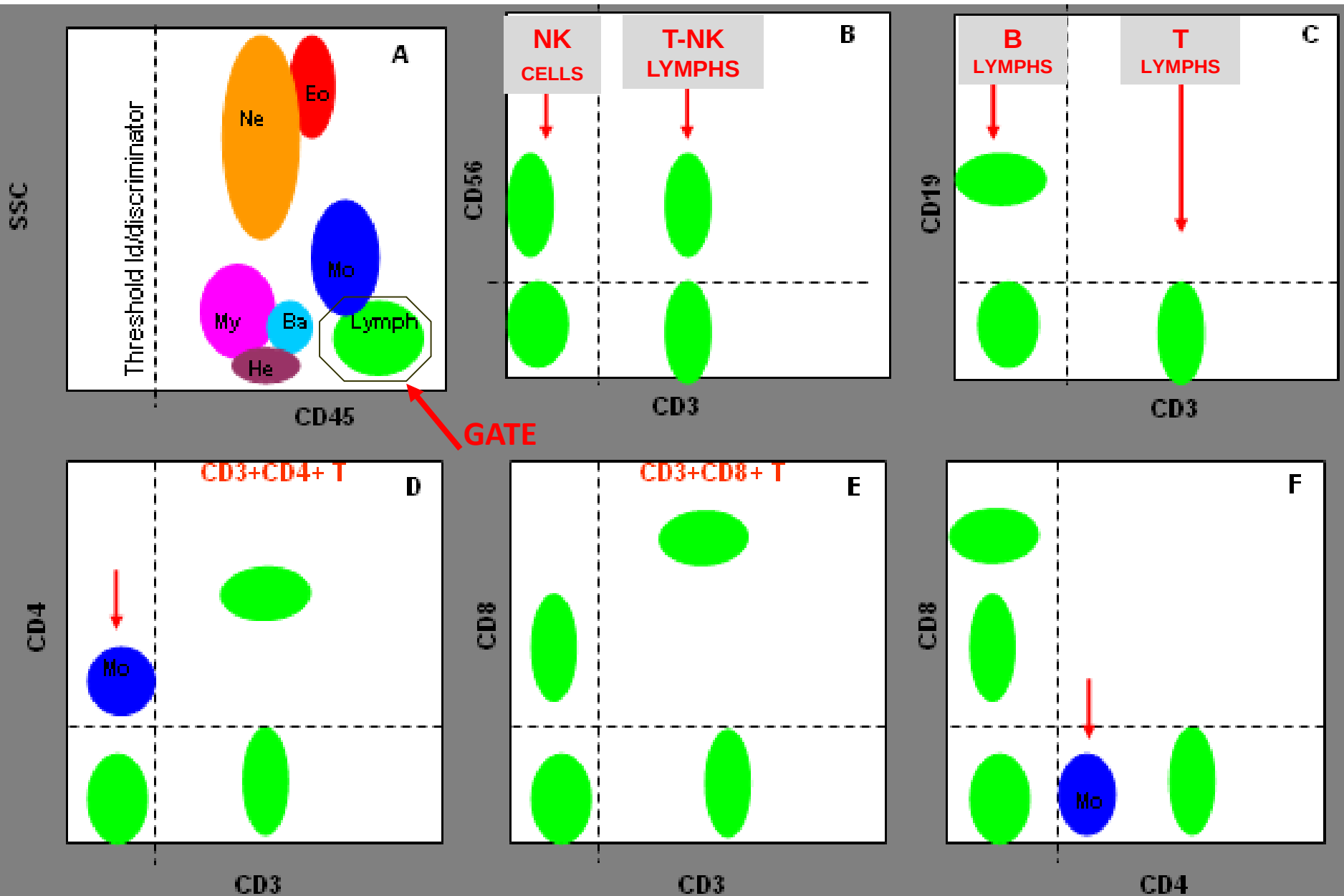


Ανάλυση δεδομένων και ερμηνεία Κυτταρομετρικά δεδομένα και απεικόνιση

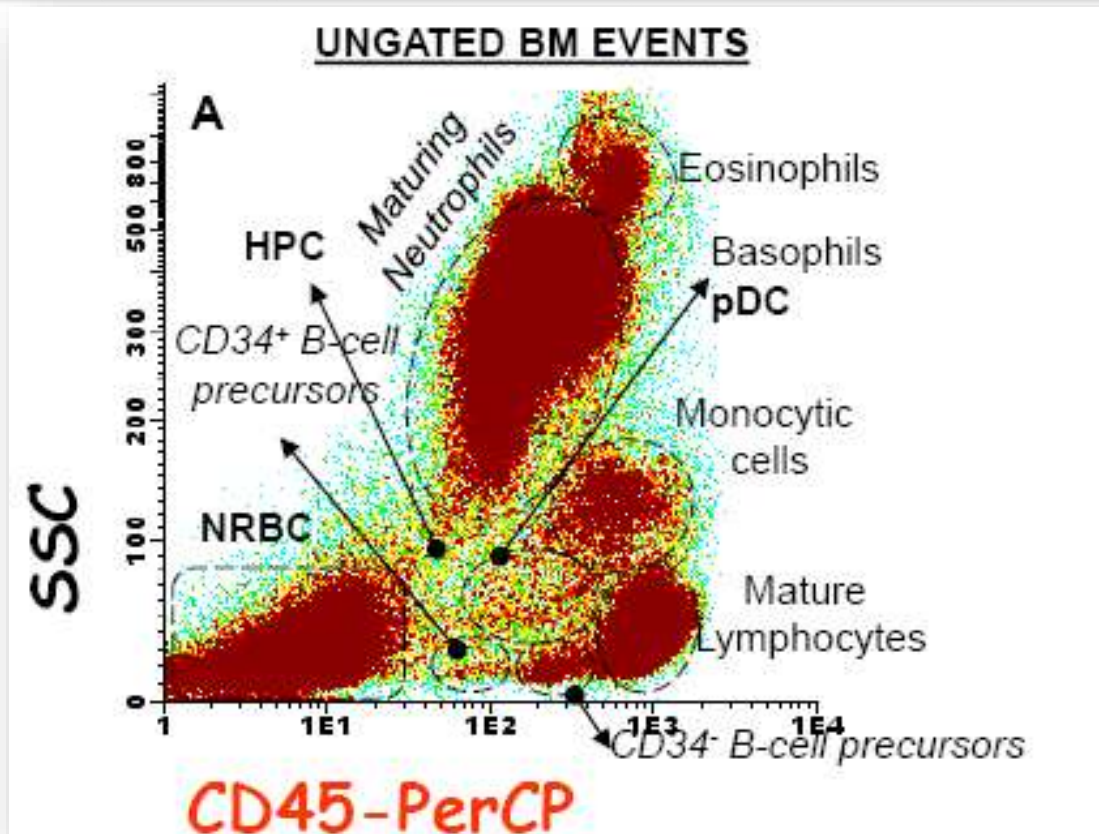
Οριοθέτηση (Gating)

Στρατηγικές οριοθέτησης (Gating Strategies)

Οριοθέτηση (Gating) - Ανάλυση δεδομένων



Γιατί Οριοθέτηση ?



- Τα δείγματα προς ανάλυση συνήθως αποτελούνται από ετερογενείς πληθυσμούς κυττάρων.
- Συχνά περιέχουν γεγονότα (events) που πρέπει να αποκλειστούν από την ανάλυση (νεκρά κύτταρα, debris, ηλεκτρονικό θόρυβο κλπ) γιατί μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένα συμπεράσματα (μη ειδική σύνδεση αντισωμάτων, λάθος υπολογισμός στατιστικών κλπ).

Οριοθέτηση/Gating

Το πρώτο και σημαντικότερο βήμα στην ανάλυση των κυτταρομετρικών δεδομένων είναι η εφαρμογή

περιοχών/*regions*

ή/και

«παραθύρων»/*gates*

που οριοθετούν τον υπό μελέτη πληθυσμό κυττάρων και αποκλείουν από την ανάλυση τους υπόλοιπους πληθυσμούς κυττάρων που βρίσκονται στο δείγμα.

Περιοχές/Regions - Παράθυρα/Gates

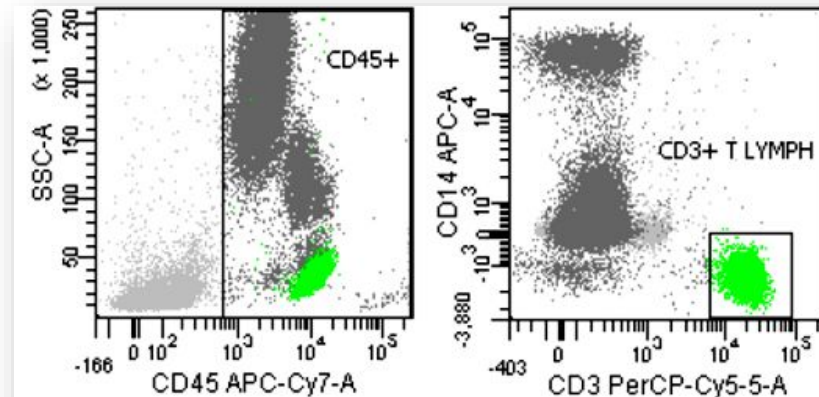
- Η οριοθέτηση βασίζεται στον καθορισμό **περιοχών/regions**
- Μια **περιοχή/region** καθορίζεται από συγκεκριμένα κριτήρια που ορίζει ο χρήστης και σ αυτήν περιλαμβάνονται μόνο τα events που πληρούν αυτά τα κριτήρια.
- Το «**παράθυρο**» **ανάλυσης/gate** είναι μία περιοχή ή ο συνδυασμός πολλών περιοχών που διαχωρίζουν τα events που θα συμπεριληφθούν στην ανάλυση από τα υπόλοιπα events που υπάρχουν στο δείγμα.
- Μία gate μπορεί να είναι όμοια με μία περιοχή ή να αποτελεί συνδυασμό δύο ή περισσότερων περιοχών.

Οριοθέτηση : Πότε, από ποιόν, σε τι βοηθάει ?

- Κατά την συλλογή των δεδομένων (acquisition gate)
- Κατά την ανάλυση των δεδομένων (analysis gate)
- Κριτήρια οριοθέτησης από τον χρήστη : Υποκειμενική
- Κριτήρια οριοθέτησης από το λογισμικό: Αντικειμενική ?

- Η επιλογή ενός **χρώματος** για κάθε περιοχή ή gate βοηθάει στην αναγνώριση του οριοθετημένου πληθυσμού μέσα στον ετερογενή πληθυσμό του δείγματος

- Με την εφαρμογή περιοχών ή παραθύρων υπολογίζονται τα **στατιστικά** (%ποσοστό, MFI) του υπό μελέτη πληθυσμού

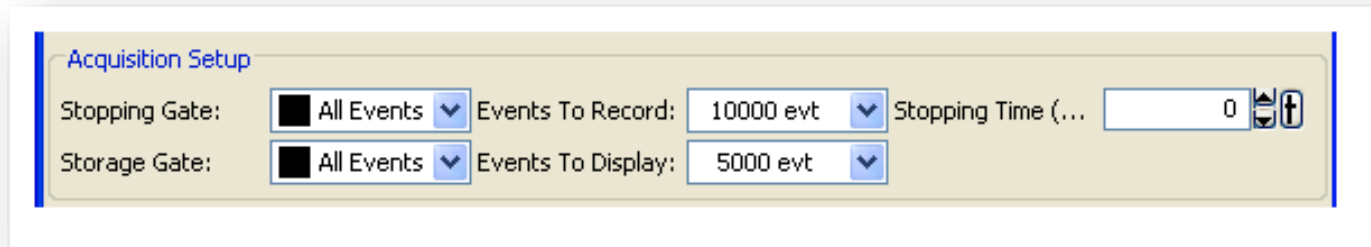


Tube: 8/56/3/4/14/45

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	35,350	####	100.0
CD45+	24,243	68.6	68.6
CD3+ T LYMPH	3,965	16.4	11.2

Οριοθέτηση κατά την συλλογή των δεδομένων (acquisition gating):

- περιορίζει τα δεδομένα που θα αποθηκευτούν κατά την συλλογή των κυττάρων (αποθηκεύονται μόνο τα δεδομένα των κυττάρων που έχουν επιλεγεί μέσα στην gate)
- καθορίζει τον αριθμό των κυττάρων του υπό μελέτη πληθυσμού που πρέπει να συλλεχθεί για να σταματήσει η μέτρηση.



Οριοθέτηση κατά την ανάλυση των δεδομένων (analysis gating):

- αποκλείει κάποια αποθηκευμένα κυτταρομετρικά δεδομένα από μια συγκεκριμένη διαδικασία ανάλυσης.

Είδη και σχήματα περιοχών και gates



polygon



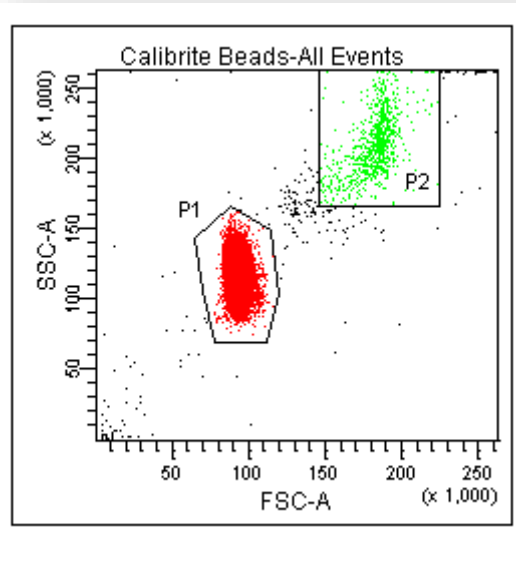
rectangular



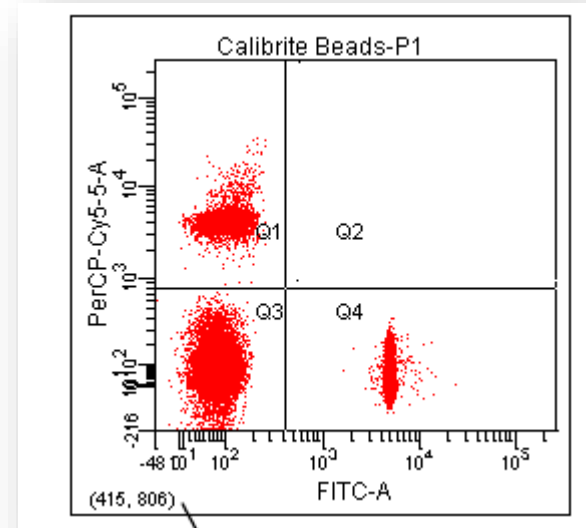
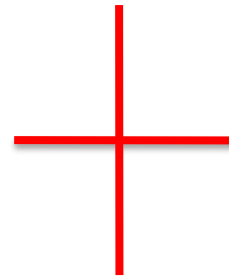
ellipsoid

- Οι πολυγωνικές, παραλληλόγραμες και ελλειψοειδής gates και τα τεταρτημόρια (quadrant) εφαρμόζονται στα dot plot, στα countour plot και στα density plot.

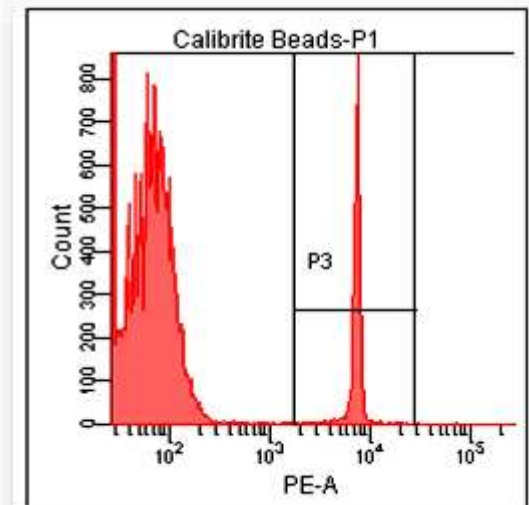
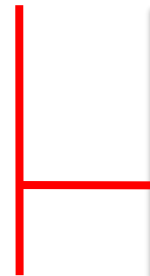
- Οι gates εύρους κατανομής (interval) εφαρμόζονται κυρίως στα ιστογράμματα αλλά μπορούν να εφαρμοστούν και στα άλλα είδη απεικόνισης.



quadrant



interval

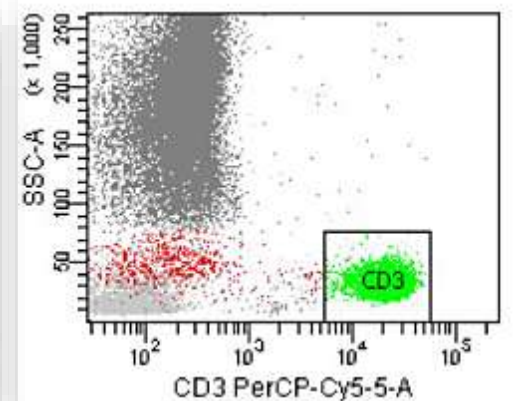
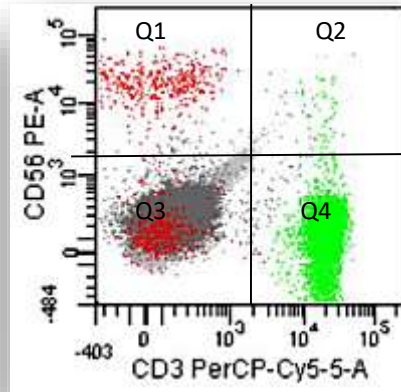
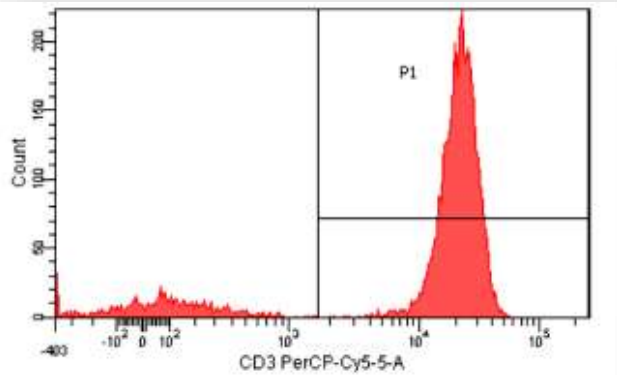


Υπολογισμός στατιστικών

-Στα ιστογράμματα και τα dot plot φθορισμού αναγνωρίζεται ο πληθυσμός που είναι θετικός ως προς την έκφραση ενός αντιγόνου.

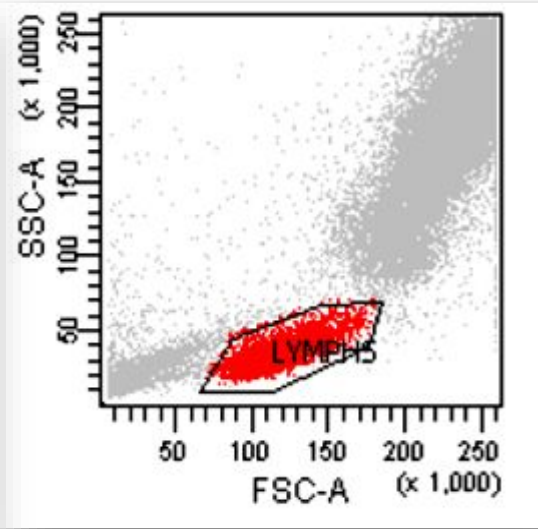
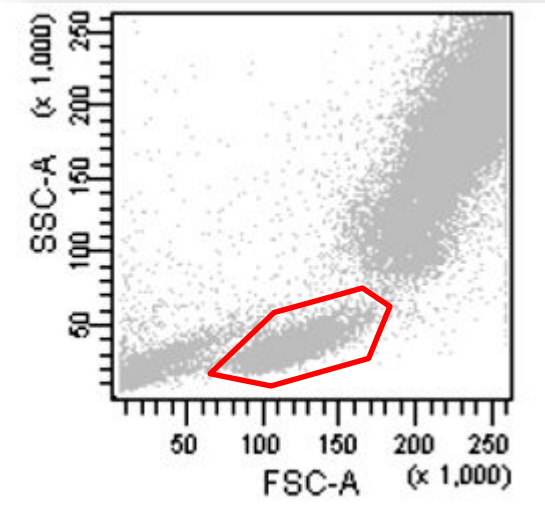
-Εφαρμόζοντας μια περιοχή (interval, quadrant, rectangular) οριοθετείται ο θετικός πληθυσμός και υπολογίζεται το ποσοστό του πληθυσμού που εκφράζει το συγκεκριμένο αντιγόνο στο σύνολο των κυττάρων που αποτελούν την gate ανάλυσης.

Gated on Lymphs

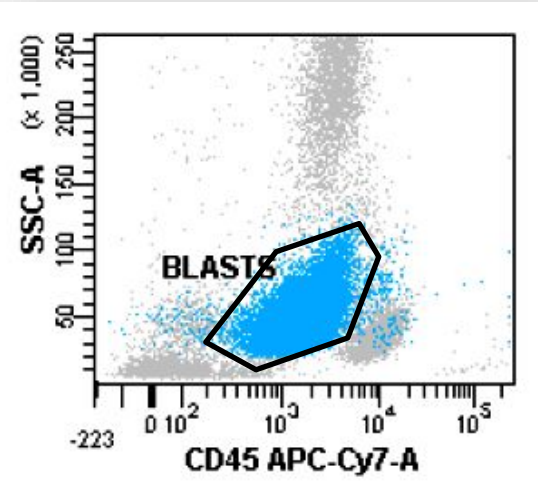
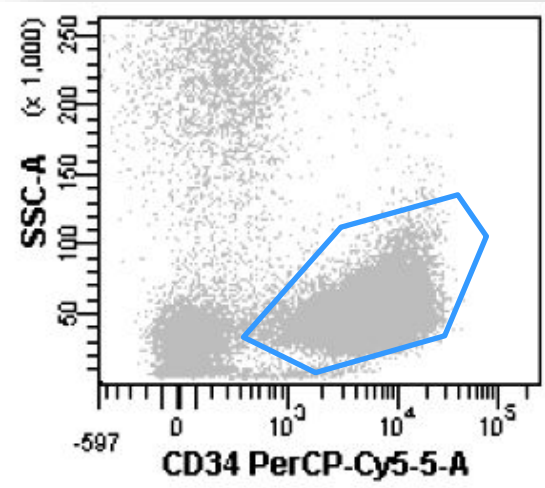


Π.χ αν η gate ανάλυσης είναι τα λεμφοκύτταρα ,το ποσοστό των CD3+ Τ λεμφοκυττάρων στο σύνολο των λεμφοκυττάρων μπορεί να υπολογιστεί ή από την περιοχή P1 στο ιστόγραμμα ή από το άθροισμα των τεταρτημορίων Q2+Q4 ή από την εφαρμογή μιας περιοχής που οριοθετεί μόνο τα κύτταρα που εκφράζουν CD3 στα dot plot

Κριτήρια οριοθέτησης

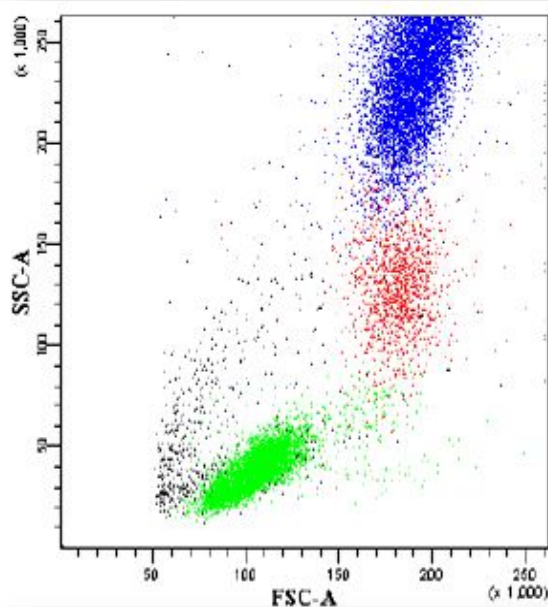


Οριοθέτηση σκεδασμού:
με κριτήριο τα σκεδαστικά
χαρακτηριστικά των κυττάρων του
υπό μελέτη πληθυσμού.
(FSC- μέγεθος / SSC -κοκκίωση)



Οριοθέτηση φθορισμού:
με κριτήριο ανοσοφαινοτυπικά
χαρακτηριστικά των κυττάρων του
υπό μελέτη πληθυσμού.
(έκφραση ή ένταση έκφρασης
συγκεκριμένου αντιγόνου πχ
CD45, CD3, CD19, CD34 κλπ)

Κριτήρια οριοθέτησης



Neutrophils



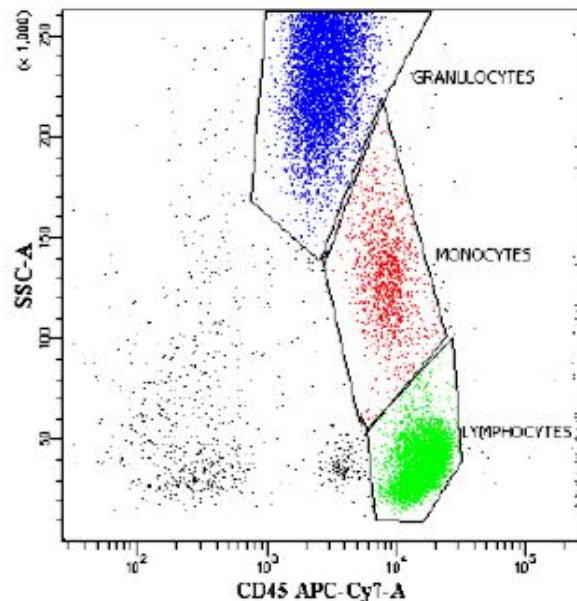
Monocytes



Lymphocytes

Οριοθέτηση με κριτήριο τον συνδυασμό σκεδαστικών και ανοσοφαινοτυπικών χαρακτηριστικών των κυττάρων του υπό μελέτη πληθυσμού.

■ Με βάση το μέγεθος (FSC), την κοκκίωση (SSC) και την έκφραση του CD45 διαχωρίζονται οι πληθυσμοί των λευκοκυττάρων.



Neutrophils



Monocytes



Lymphocytes

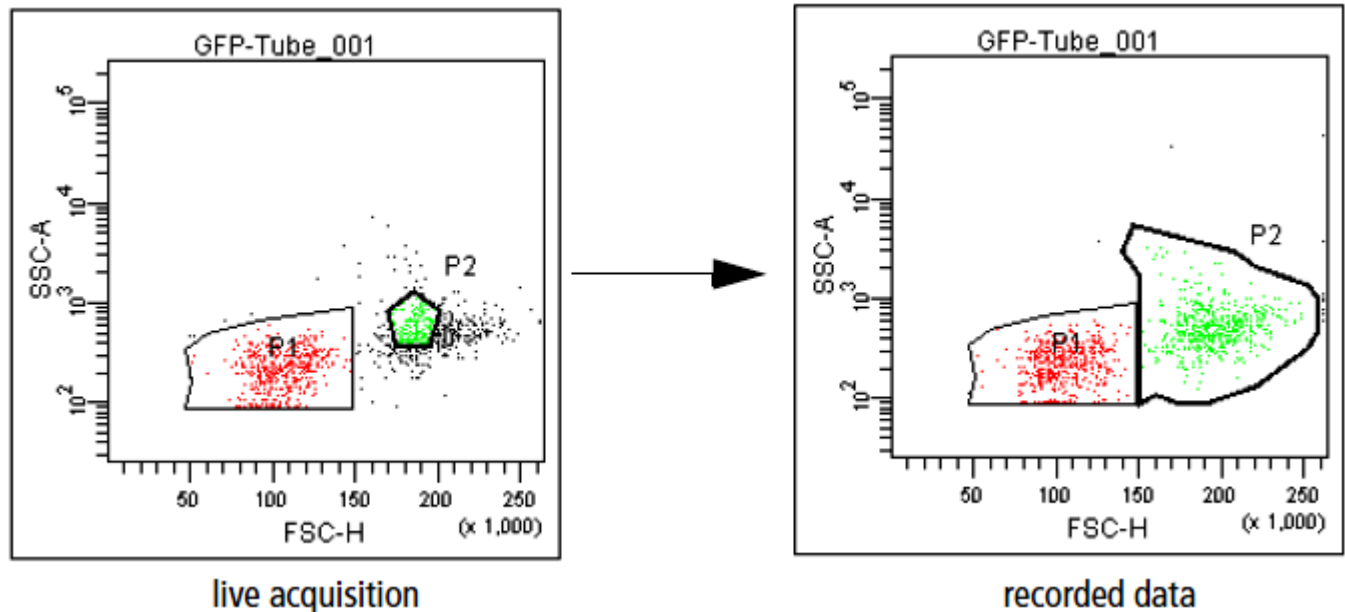
■ **Λεμφοκύτταρα** : μικρά κύτταρα, χωρίς κοκκία, με έντονη έκφραση CD45.

■ **Μονοκύτταρα** : μεγαλύτερα κύτταρα, με λίγα κοκκία, ασθενέστερη έκφραση CD45.

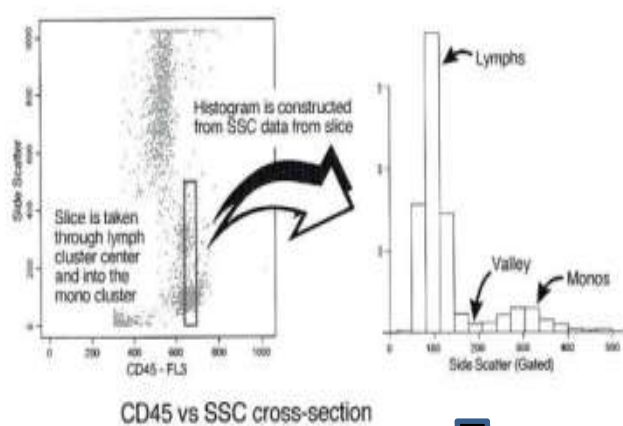
■ **Ουδετερόφιλα** : μεγάλα κύτταρα, με πολλά κοκκία, και ασθενή έκφραση CD45.

Αυτόματες περιοχές και gates

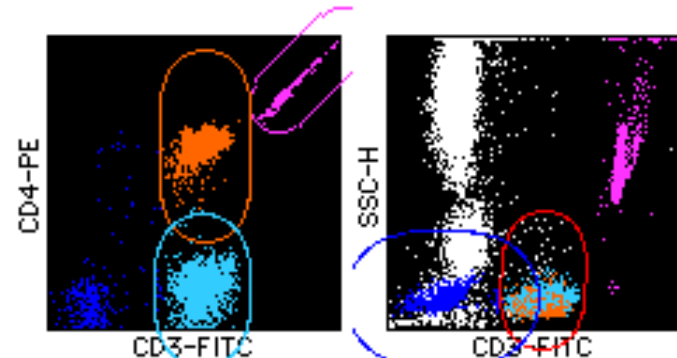
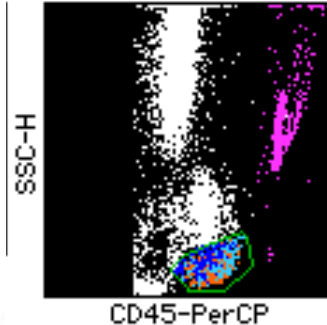
- Εκτός από τις περιοχές και gates που εφαρμόζει ο χρήστης κατά την συλλογή ή την ανάλυση των δεδομένων, τα λογισμικά των περισσότερων κυτταρομετρητών δίνουν την δυνατότητα εφαρμογής **αυτόματων** περιοχών και gates μετά από επιλογή ενός συγκεκριμένου πληθυσμού ή και την εφαρμογή περιοχών που το μέγεθος τους αυξομειώνεται αυτόματα αντίστοιχα με το μέγεθος του πληθυσμού.



Προγράμματα λογισμικού με αυτόματες περιοχές και gates

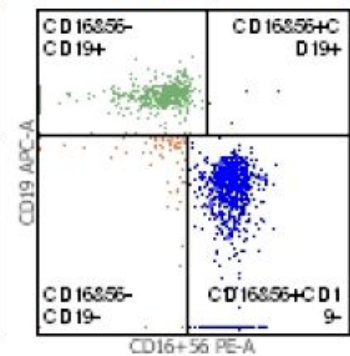
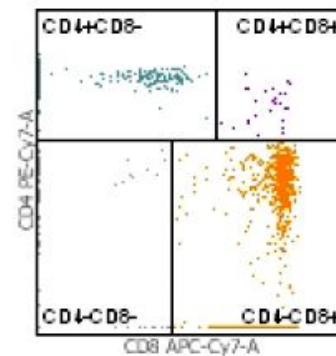
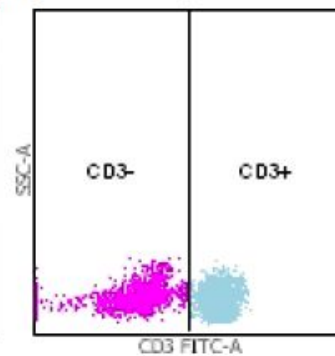
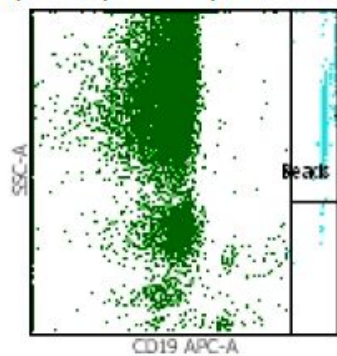
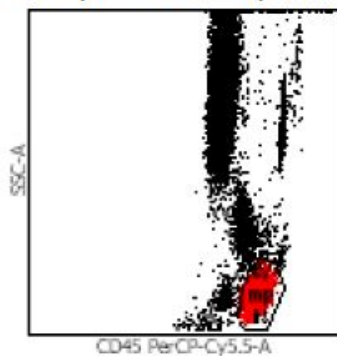


Expert gate
λεμφοκυττάρων



Attractors : ημικυκλικές περιοχές το κέντρο των οποίων αντιστοιχεί στο κέντρο κατανομής του πληθυσμού και προσαρμόζουν αυτόματα την θέση τους σε τυχόν μετατοπίσεις της θέσης του

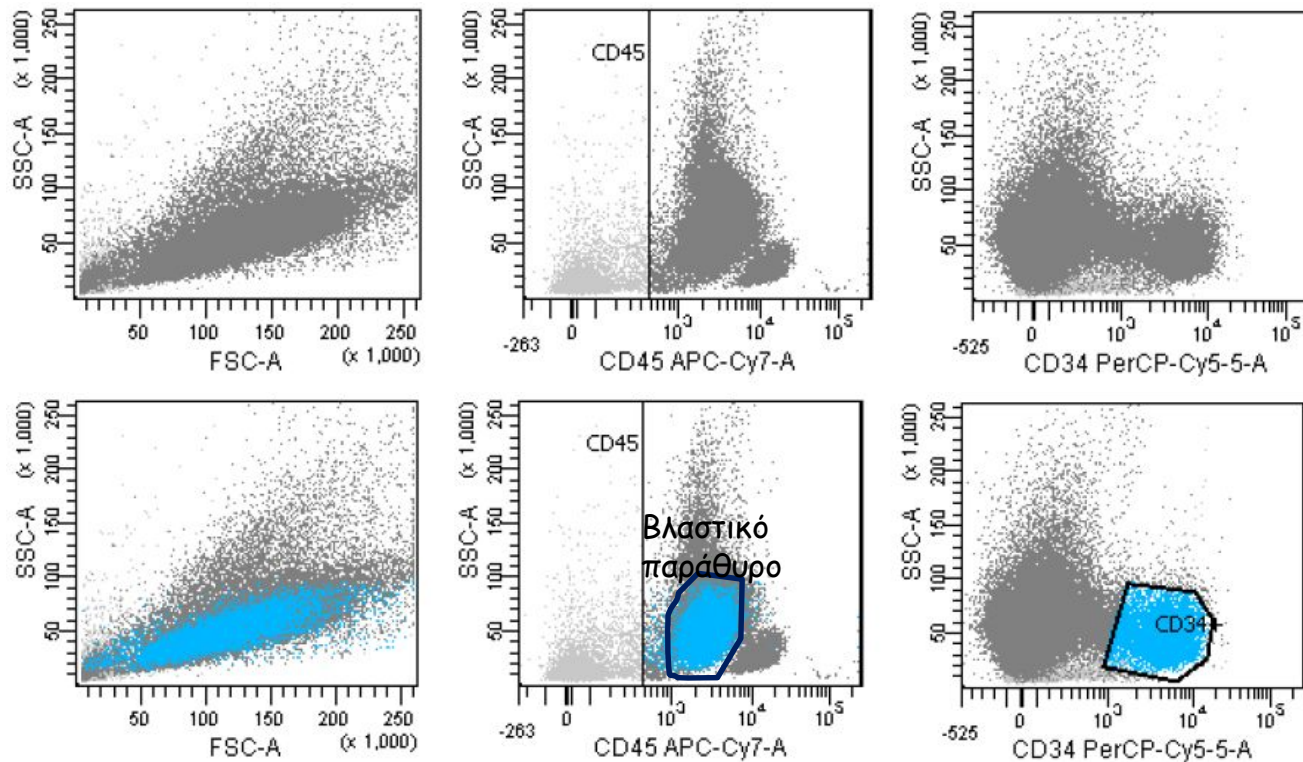
CD3/CD16+56/CD45/CD4/CD19/CD8 TruC



Σύνολο συμβάντων: 20862

Back-gating

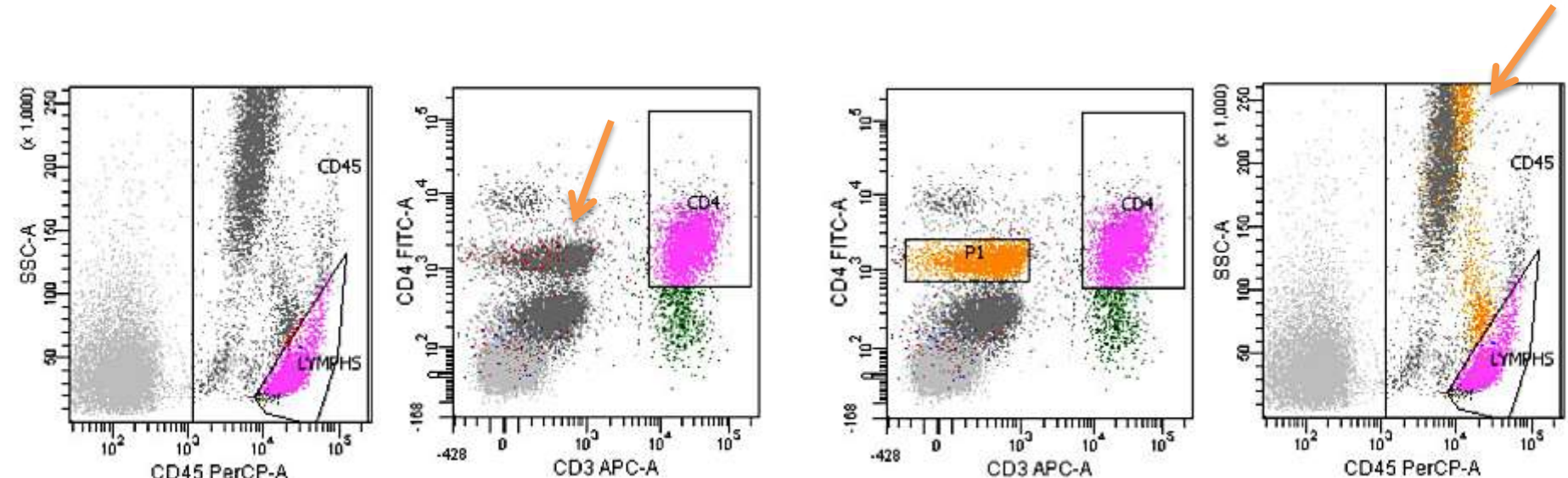
Το back gating βασίζεται στην αναγνώριση και οριοθέτηση ενός πληθυσμού με βάση τα πιο σταθερά χαρακτηριστικά του που είναι το μέγεθος (FSC), η κοκκίωση (SSC) και η έκφραση ενός χαρακτηριστικού αντιγόνου (CD45).



Στις περιπτώσεις που τα όρια της αρχικής gate ανάλυσης δεν είναι σαφή και ευδιάκριτα εφαρμόζοντας με οριοθέτηση φθορισμού μια περιοχή με **χρώμα** στον πληθυσμό που εκφράζει ένα δείκτη χαρακτηριστικό των κυττάρων που θέλουμε να αναλύσουμε αναζητούμε την θέση που καταλαμβάνουν τα events που περιλαμβάνονται στην επιλεγμένη περιοχή στα αρχικά dot plot ανάλυσης FSC/SSC και CD45/SSC για να τοποθετήσουμε την gate ανάλυσης.

Back-gating

Το back-gating βοηθάει να ξεκαθαρίσουμε αν κάποιες εικόνες στα dot plot φθορισμού οφείλονται σε αυτοφθορισμό, μη ειδική σύνδεση, artifacts ή αν τα events της gate που αναλύουμε είναι νεκρά κύτταρα κλπ



Για παράδειγμα, τοποθετώντας μια **περιοχή P1** στα κύτταρα που εκφράζουν ασθενώς CD4 και δεν εκφράζουν CD3, βλέπουμε ότι είναι κύτταρα με πολύ ψηλό SSC (πιθανόν ηωσινόφιλα). Άρα η εικόνα αυτή πιθανόν να οφείλεται σε μη ειδικό φθορισμό.

Στρατηγικές οριοθέτησης

Gating strategies

Κατά την ανάλυση των δεδομένων ο χρήστης εφαρμόζει διαδοχικές οριοθετήσεις (sequential gating) για να απομονώσει τους υπό μελέτη πληθυσμούς ακολουθώντας συγκεκριμένη στρατηγική .

Οι στρατηγικές οριοθέτησης που υποστηρίζονται από τα λογισμικά των περισσοτέρων κυτταρομετρητών είναι:

Hierarchical Gating

Boolean Gating

Ιεραρχική οριοθέτηση - Hierarchical gating

Τα κριτήρια οριοθέτησης της parent gate «κληρονομούνται» στους υποπληθυσμούς που προέρχονται από αυτήν κάθε φορά.

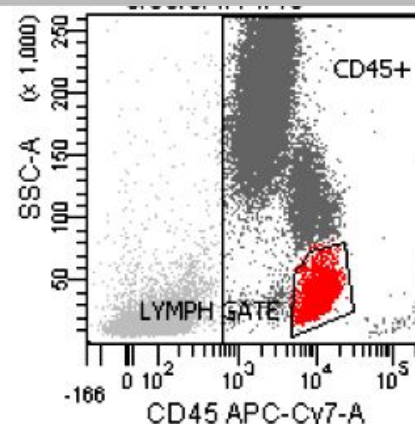
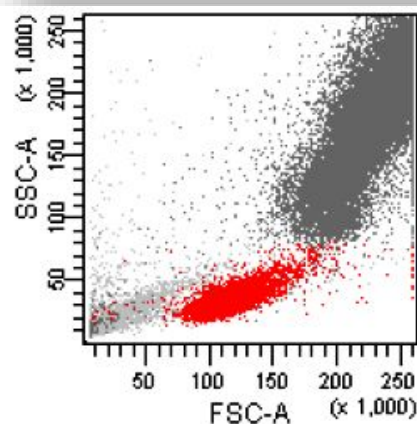
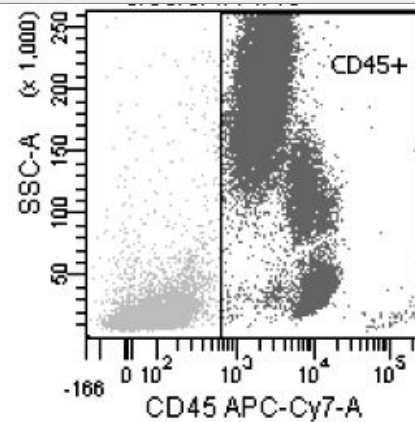
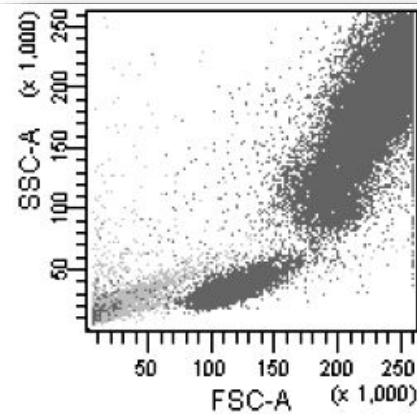
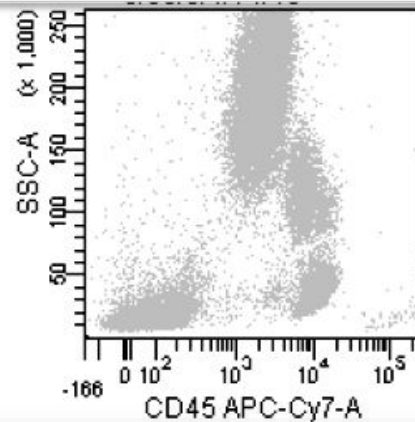
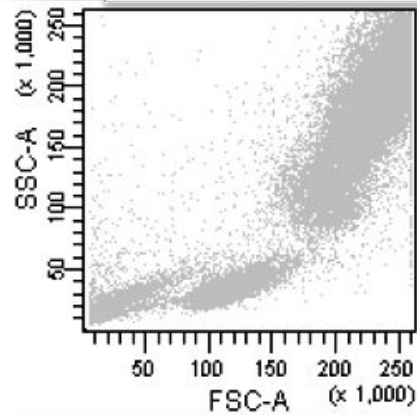


- Εφαρμόζεται όταν οι υποπληθυσμοί που θέλουμε να μελετήσουμε αποτελούν υποσύνολα ενός μεγαλύτερου συνόλου.

- Τοποθετούμε διαδοχικά (sequential) περιοχές που οριοθετούν υποπληθυσμούς που προέρχονται από μεγαλύτερους πληθυσμούς (parent) δημιουργώντας ένα γενεολογικό δέντρο του υπό μελέτη πληθυσμού.

- Απλή και Υποκειμενική στρατηγική οριοθέτησης

Hierarchical gating



Tube: 8/56/3/4/14/45

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	35,350	####	100.0

Οριοθέτηση φθορισμού

Tube: 8/56/3/4/14/45

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	35,350	####	100.0
CD45+	24,243	68.6	68.6

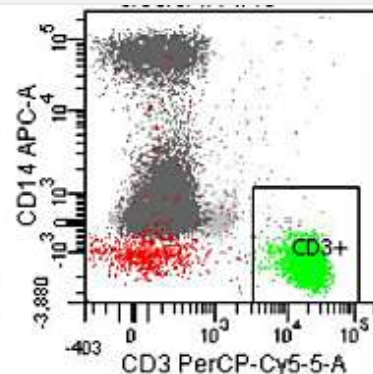
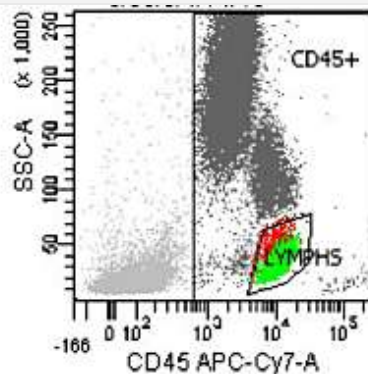
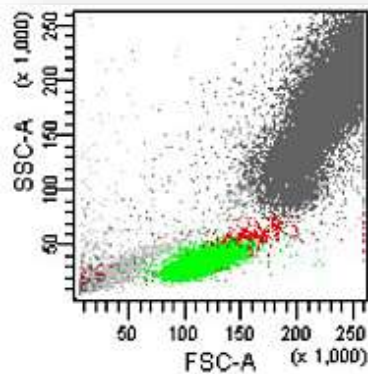
Οριοθέτηση σκεδασμού και φθορισμού

Tube: 8/56/3/4/14/45

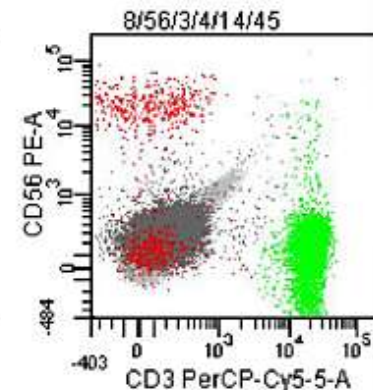
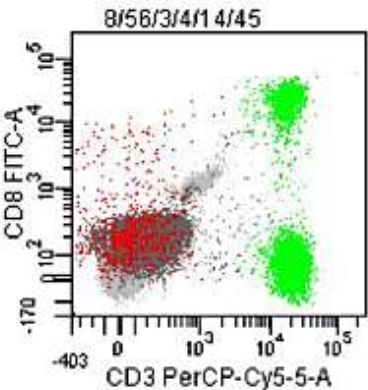
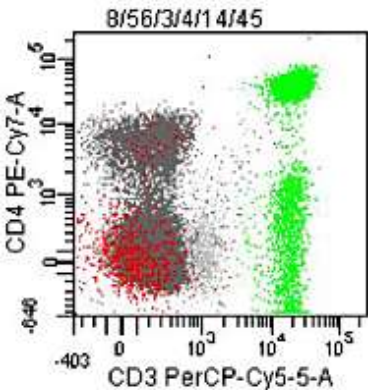
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	35,350	####	100.0
CD45+	24,243	68.6	68.6
LYMPH GATE	4,699	19.4	13.3

Population	Parent Name	%Parent	%Grand Pa...
All Events	####	####	####
CD45+	All Events	68.6	####
LYMPH GATE	CD45+	19.4	13.3

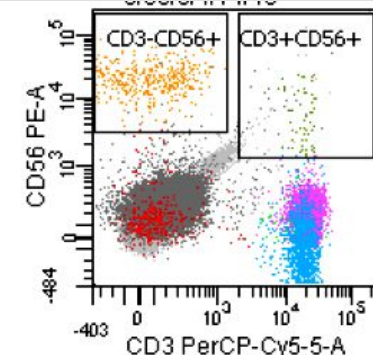
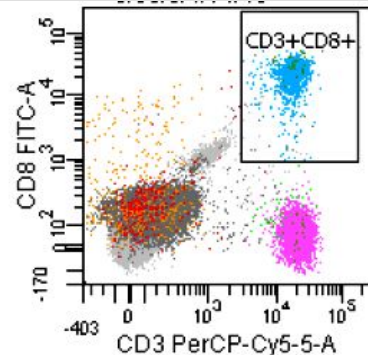
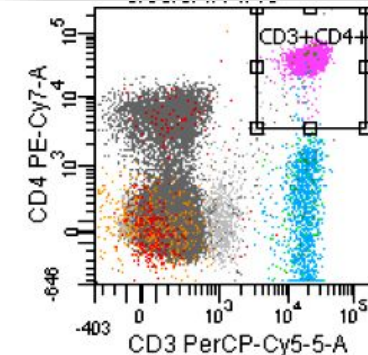
Hierarchical gating



Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	35,350	####	100.0
CD45+	24,243	68.6	68.6
LYMPHS	4,690	19.3	13.3
CD3+	3,980	84.9	11.3



Population	Parent Name	%Parent	%Grand Par...
All Events	####	####	####
CD45+	All Events	68.6	####
LYMPHS	CD45+	19.3	13.3
CD3+	LYMPHS	84.9	16.4

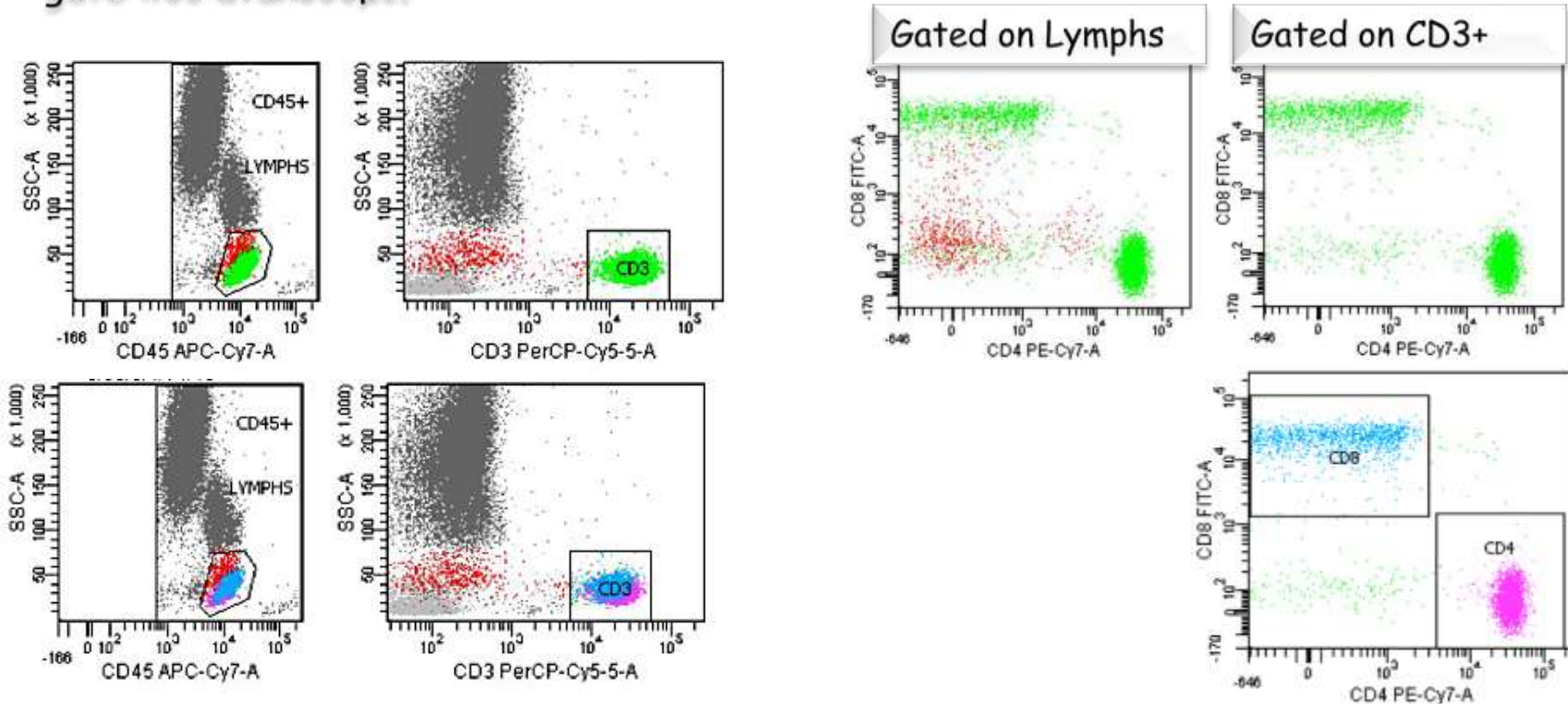


Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	35,350	####	100.0
CD45+	24,243	68.6	68.6
LYMPHS	4,690	19.3	13.3
CD3	3,988	85.0	11.3
CD3+CD4+	2,643	66.3	7.5
CD3+CD8+	1,223	30.7	3.5
CD3-CD56+	384	8.2	1.1
CD3+CD56+	64	1.4	0.2

Population	Parent Name	%Parent	%Grand Pa...
All Events	####	####	####
CD45+	All Events	68.6	####
LYMPHS	CD45+	19.3	13.3
CD3	LYMPHS	85.0	16.5
CD3+CD4+	CD3	66.3	56.4
CD3+CD8+	CD3	30.7	26.1
CD3-CD56+	LYMPHS	8.2	1.6
CD3+CD56+	LYMPHS	1.4	0.3

Hierarchical gating

Στα στικτογράμματα (dot plots) μπορούμε να επιλέξουμε να φαίνονται μόνο τα events της gate που αναλύουμε.



Tube: 8/56/3/4/14/45

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	35,350	###	100.0
CD45+	24,243	68.6	68.6
LYMPHS	4,727	19.5	13.4
CD3	3,966	83.9	11.2
CD4	2,606	65.7	7.4
CD8	1,102	27.8	3.1

Population	Parent Name	%Parent	%Grand Parent
LYMPHS	CD45+	19.5	13.4
CD3	LYMPHS	83.9	16.4
CD4	CD3	65.7	55.1
CD8	CD3	27.8	23.3

Τα CD4+ Τ λεμφοκύτταρα αποτελούν το 65,7% των CD3+ (parent) και το 55,1% των λεμφοκυττάρων (grandparent)

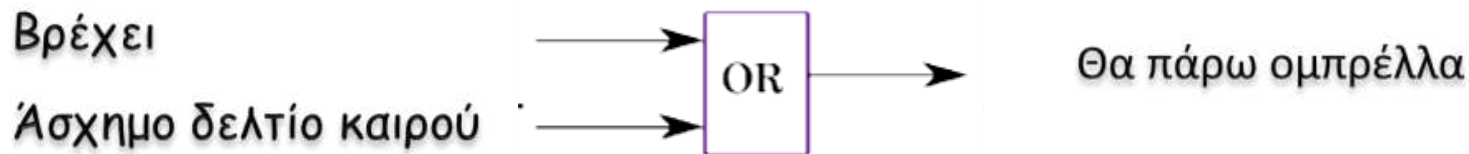
Boolean άλγεβρα και λογική οριοθέτηση

-Η λειτουργία των ψηφιακών ηλεκτρονικών υπολογιστών βασίζεται στα δυαδικά συστήματα.

-Το πρώτο δυαδικό σύστημα δημιουργήθηκε από τους αρχαίους Έλληνες φιλοσόφους και ονομάστηκε **προτασιακή λογική**:

«Μία πρόταση μπορεί να είναι ΑΛΗΘΕΙΑ ή ΛΑΘΟΣ και αποτελείται από επιμέρους προτάσεις που συνδέονται μεταξύ τους με τις τρεις λογικές συζεύξεις ΚΑΙ (AND), Ή (OR), ΟΧΙ (NOT)»

Π.χ Θα πάρω ομπρέλλα μαζί μου αν βρέχει ή αν ακούσω άσχημο δελτίο καιρού.



Πίνακας Αλήθειας της σύζευξης Ή' (OR)

Βρέχει	Άσχημο δελτίο	Ομπρέλλα
ΛΑΘΟΣ	ΛΑΘΟΣ	ΛΑΘΟΣ
ΛΑΘΟΣ	ΑΛΗΘΕΙΑ	ΑΛΗΘΕΙΑ
ΑΛΗΘΕΙΑ	ΛΑΘΟΣ	ΑΛΗΘΕΙΑ
ΑΛΗΘΕΙΑ	ΑΛΗΘΕΙΑ	ΑΛΗΘΕΙΑ

Boolean Άλγεβρα

Ο μαθηματικός George Boole (1815-1864) για να απλοποιήσει την εφαρμογή των σύνθετων δυαδικών συζεύξεων ανέπτυξε την Boolean άλγεβρα χρησιμοποιώντας συνήθη αλγεβρικά σύμβολα και τους αριθμούς 1 για τον όρο ΑΛΗΘΕΙΑ και 0 για τον όρο ΛΑΘΟΣ.

Πίνακες Αλήθειας των Boolean operators AND, OR, NOT

AND ·		
A	B	R
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1

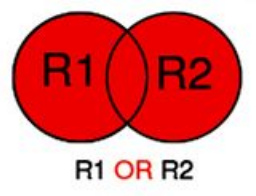
OR +		
A	B	R
0	0	0
0	1	1
1	0	1
1	1	1

NOT '	
A	R
0	1
1	0

Οι τελεστές της Boolean άλγεβρας μπορούν να εφαρμοστούν σε κάθε ηλεκτρονικό κύκλωμα του οποίου οι είσοδοι (inputs) και έξοδοι (outputs) αντιπροσωπεύουν τις τιμές 0 και 1

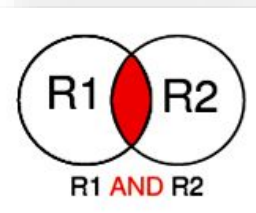
Boolean Gating

Ανάλογα με τον πληθυσμό που θέλουμε να αναλύσουμε εφαρμόζοντας τους Boolean τελεστές δημιουργούμε μια gate που περιέχει :



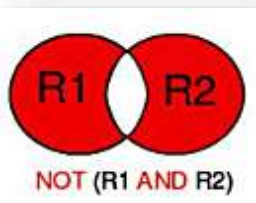
Όλα τα events των περιοχών R1 και R2.

ή



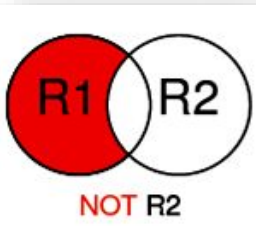
Όλα τα events που βρίσκονται στην τομή των περιοχών R1 και R2.

ή

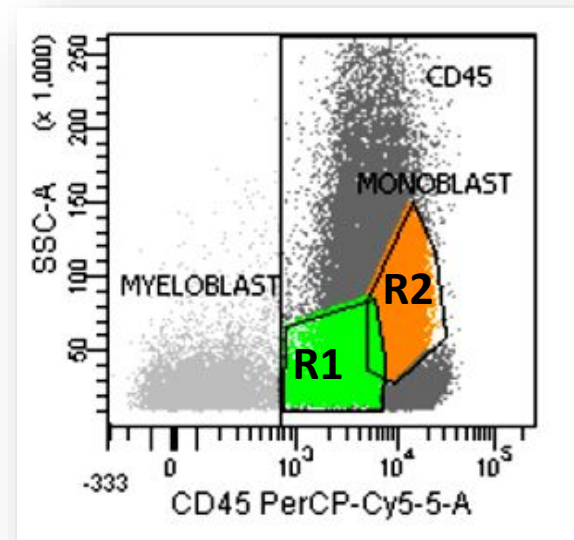


Όλα τα υπόλοιπα events εκτός από αυτά που βρίσκονται στην τομή των περιοχών R1 και R2.

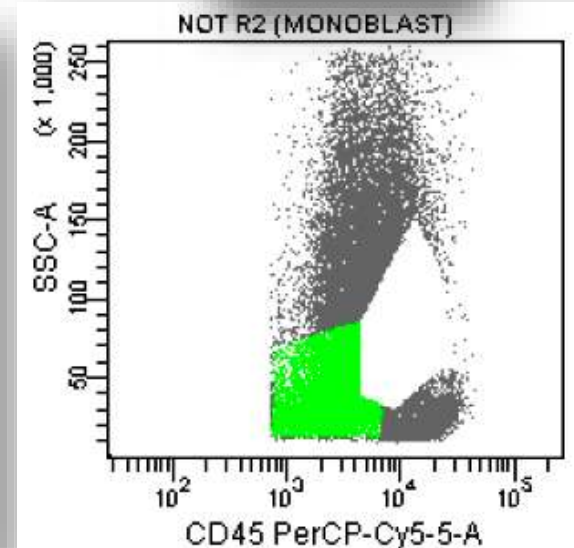
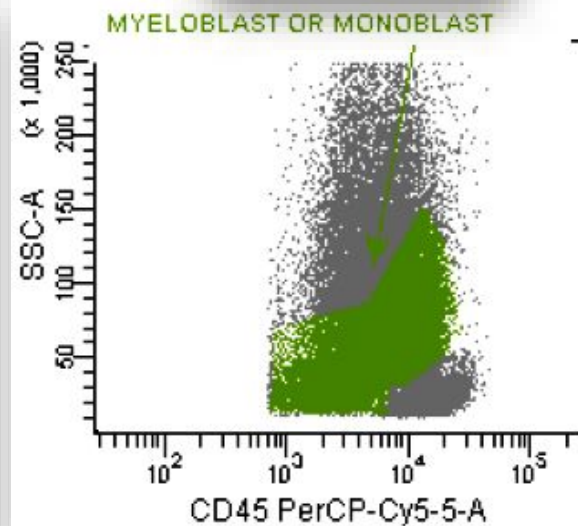
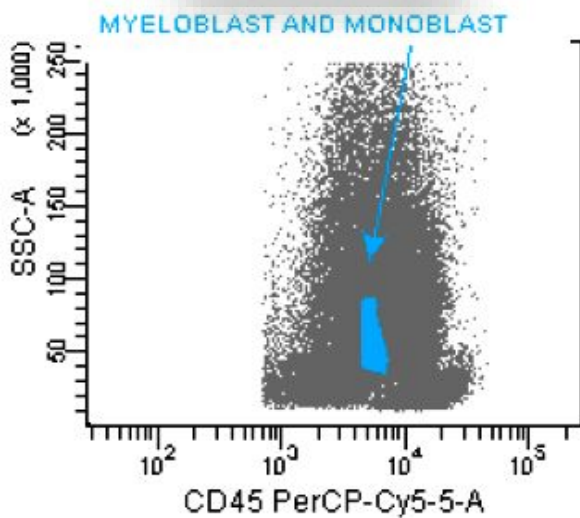
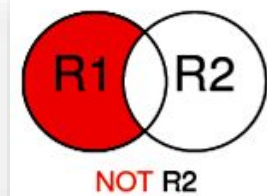
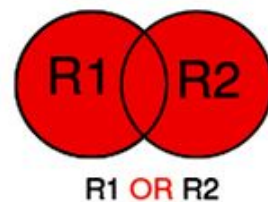
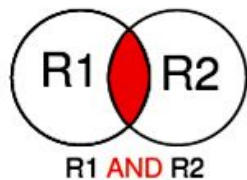
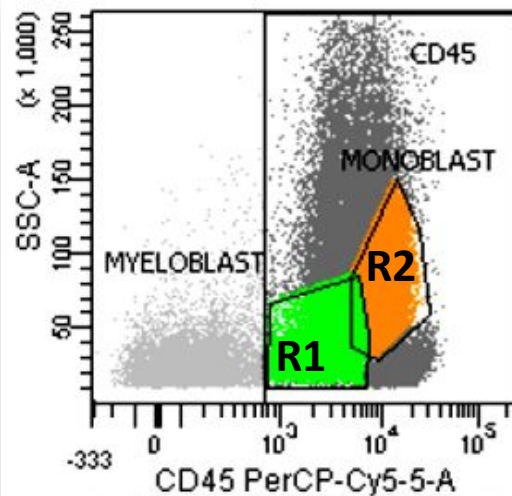
ή



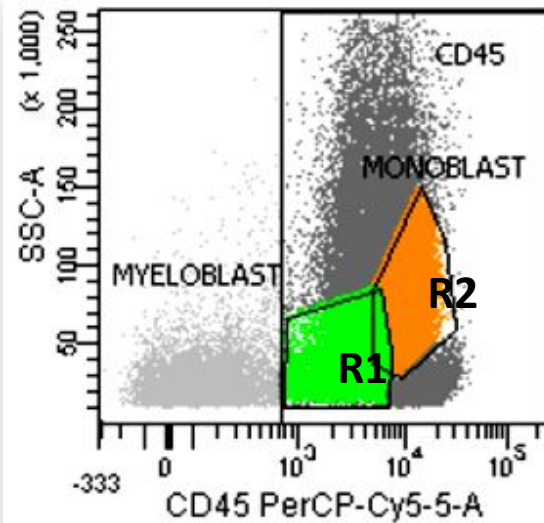
Όλα τα events που βρίσκονται μόνο στην περιοχή R1.



Boolean Gating



Boolean Gating

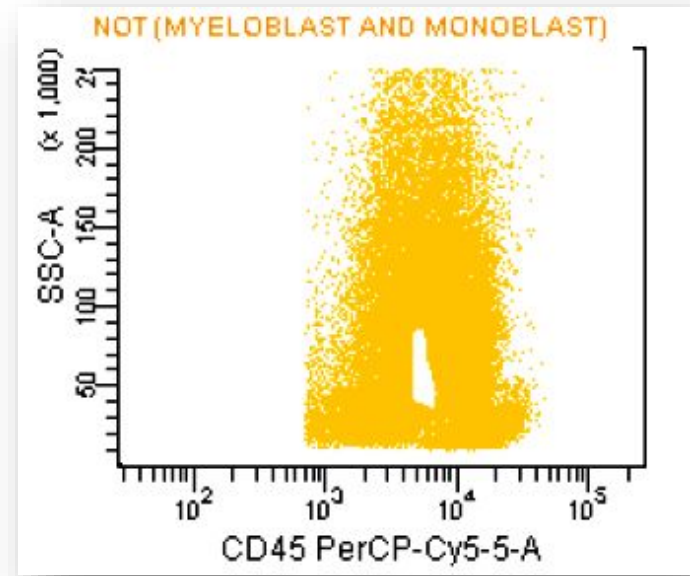
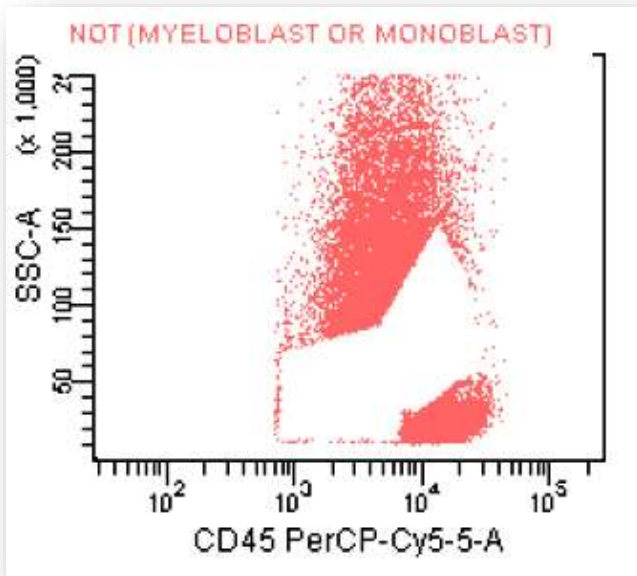


NOT (R1 OR R2)

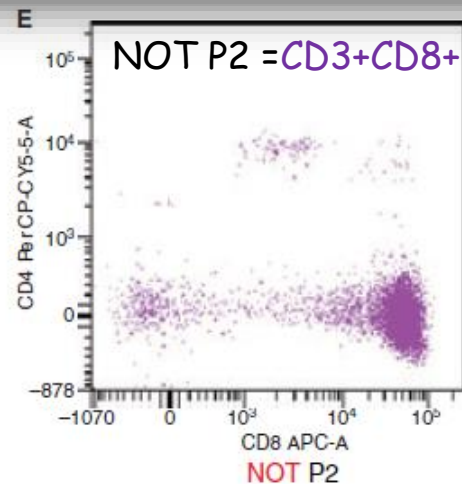
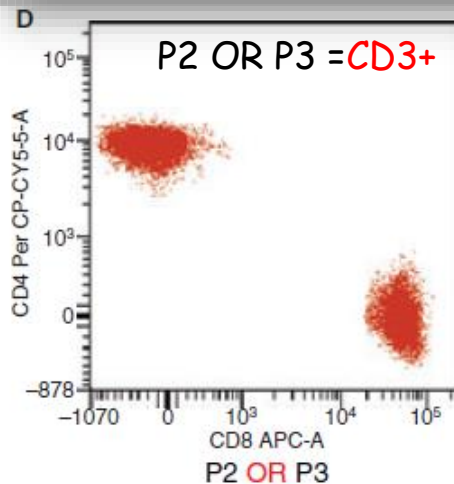
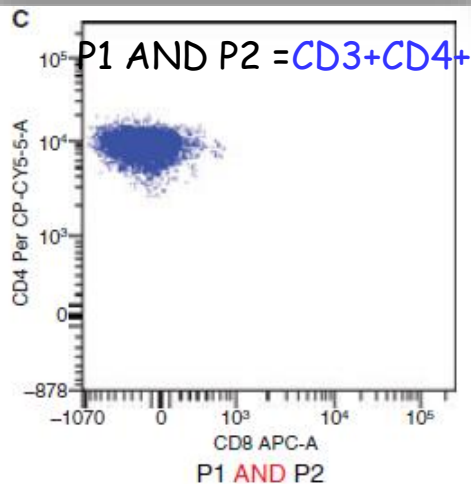
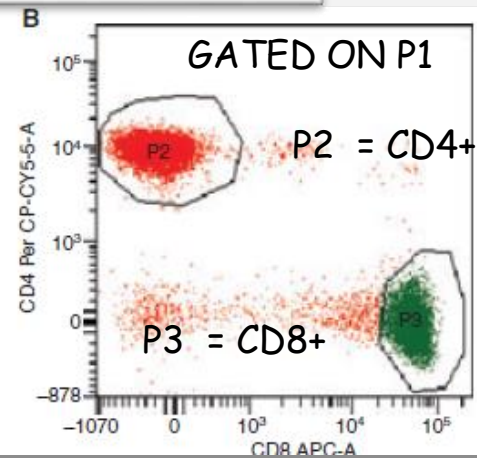
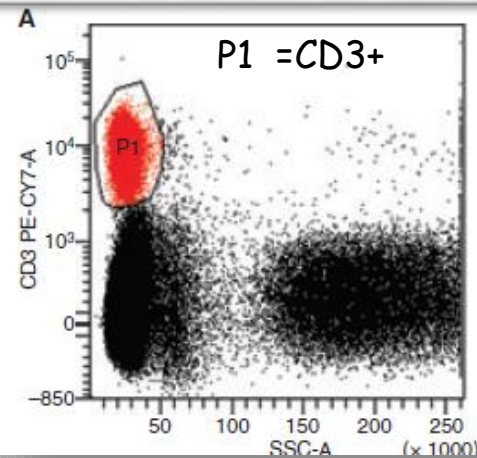
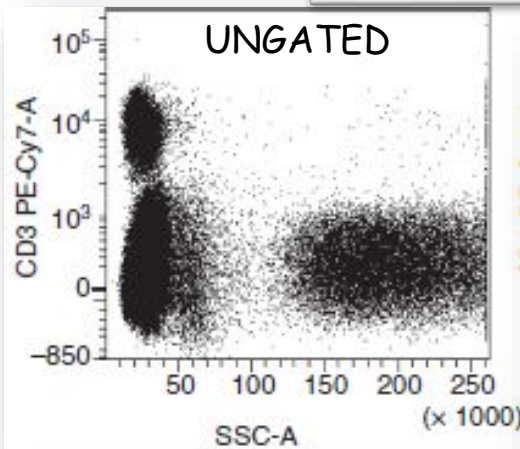
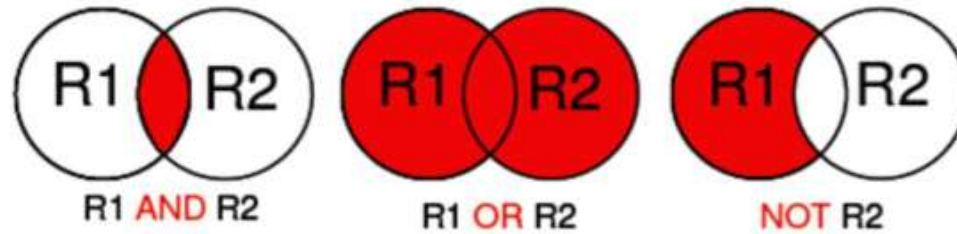
Όλα τα events εκτός από αυτά που περιέχονται στις R1 και R2

NOT (R1 AND R2)

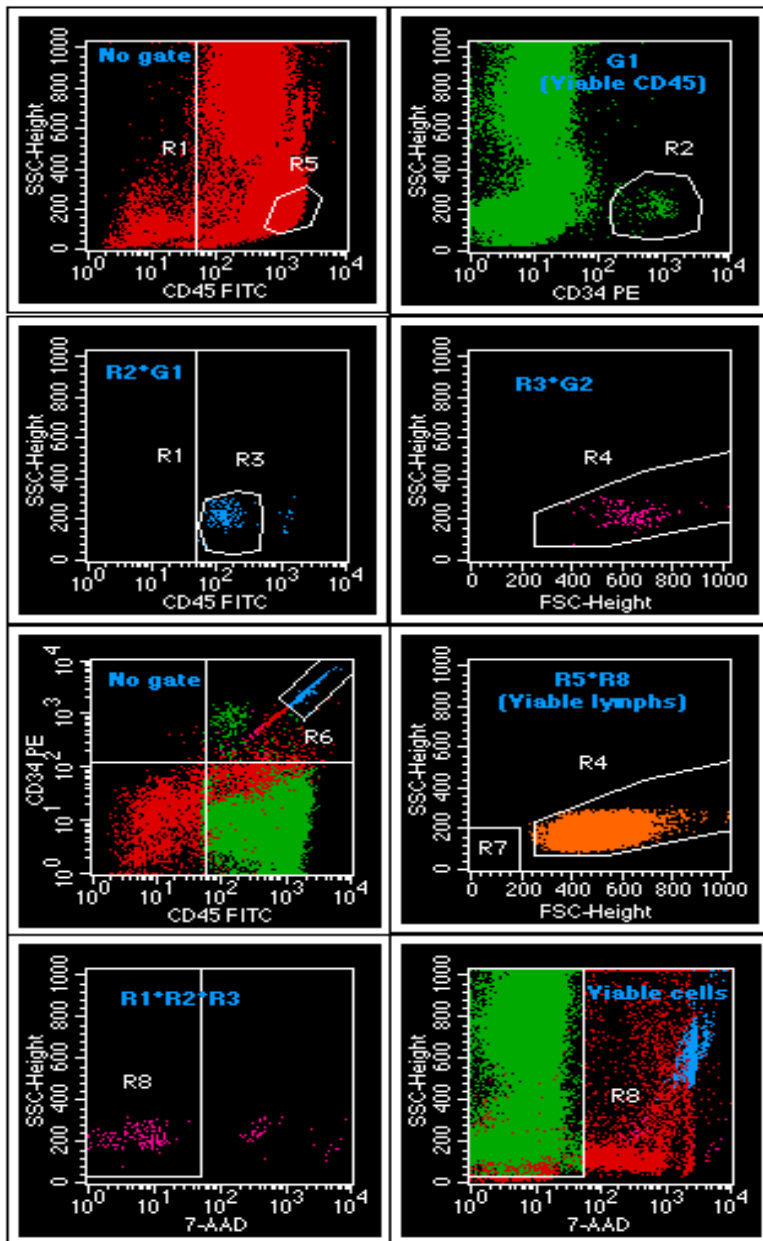
Όλα τα events εκτός από αυτά που περιέχονται στην τομή των R1 και R2



Boolean Gating



Boolean στρατηγική για την μέτρηση των CD34+ (rare event analysis)



Κριτήρια ISHAGE για τα CD34+ HPC

- Ζωντανά κύτταρα
- CD34+
- CD45dim
- Χαμηλό SSC
- FSC λίγο μεγαλύτερο από τα λεμφοκύτταρα

Η διαδοχική οριοθέτηση με την Boolean στρατηγική εξασφαλίζει ότι τα **CD34+** που μετρήθηκαν πληρούν όλα τα κριτήρια των κατευθυντήριων οδηγιών της ISHAGE

Multi color	Color	Label	Definition
☒		Viable CD45	R1 and R8
☒		G2	R2 and "Viable CD45"
☒		G3	R3 and G2
☒		Viable CD34	R4 and G3
☒		Beads	R6
☒		Total CD34	R1 and R2 and R3
☒		Viable Lymphs	R5 and R8
☒		Total CD45	R1 and not Beads
☒		Debris	R7
☒		G10	R10

Ποια στρατηγική θα επιλέξουμε ?

Βασίζονται και οι δύο στην ικανότητα και τις γνώσεις αυτού που αναλύει τα δεδομένα

Υποκειμενική

**Hierarchical
Gating**

vs

Λιγότερο Υποκειμενική ?

**Boolean
Gating**

-Απλή

-Εφαρμόζεται κυρίως στις περιπτώσεις που ο χρήστης γνωρίζει εκ των προτέρων τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των υποπληθυσμών που θα προκύψουν από την ανάλυση.

-Μπορεί να εφαρμοστεί όταν είναι σαφής ο διαχωρισμός του θετικού και αρνητικού ως προς το αντιγόνο πληθυσμού

-Τα κριτήρια οριοθέτησης του parent πληθυσμού, «κληρονομούνται» στους υποπληθυσμούς που προέρχονται από αυτόν και αυτή η ιεραρχία αναγνωρίζεται εύκολα.

-Πιο πολύπλοκη

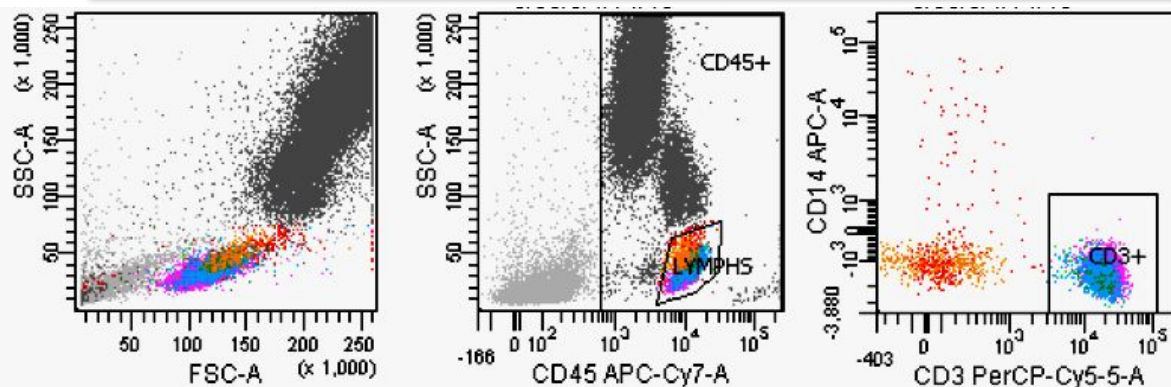
-Δίνει την δυνατότητα να μελετηθούν όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί των δεδομένων και μπορεί να εφαρμοστεί στις περιπτώσεις που δεν είναι γνωστοί οι υποπληθυσμοί που θα προκύψουν από την ανάλυση.

-Καλύτερη στρατηγική όταν δεν είναι σαφής ο διαχωρισμός του θετικού και αρνητικού ως προς το αντιγόνο πληθυσμού

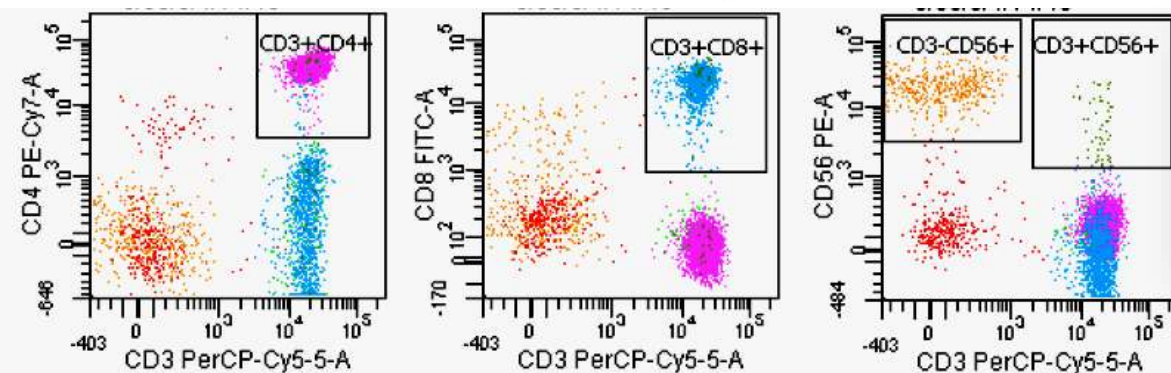
-Συστήνεται για την ανάλυση σπάνιων δεδομένων (rare event analysis) όπως είναι η μέτρηση των CD34+ , η ανίχνευση MRD, μελέτη αντιγονοειδικής απάντησης κλπ.

Συνήθως χρησιμοποιείται συνδυασμός των δύο στρατηγικών οριοθέτησης

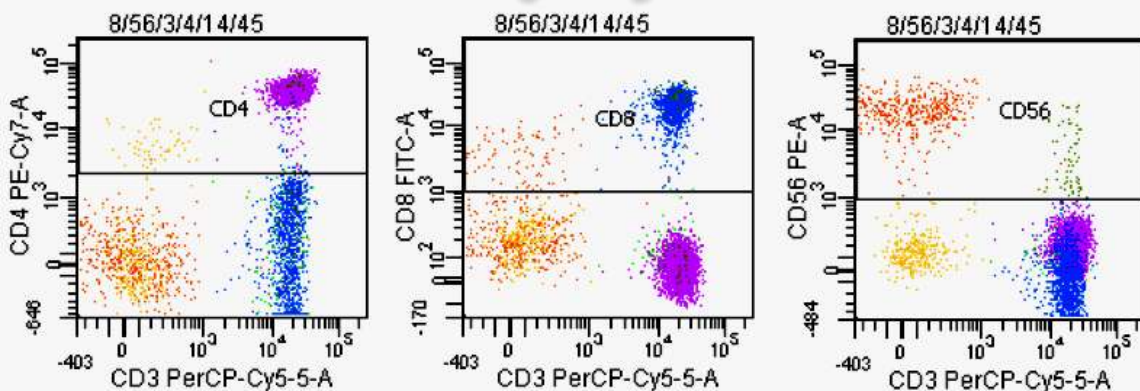
Ανάλυση με Ιεραρχική ή Boolean στρατηγική



Hierarchical gating



Boolean gating

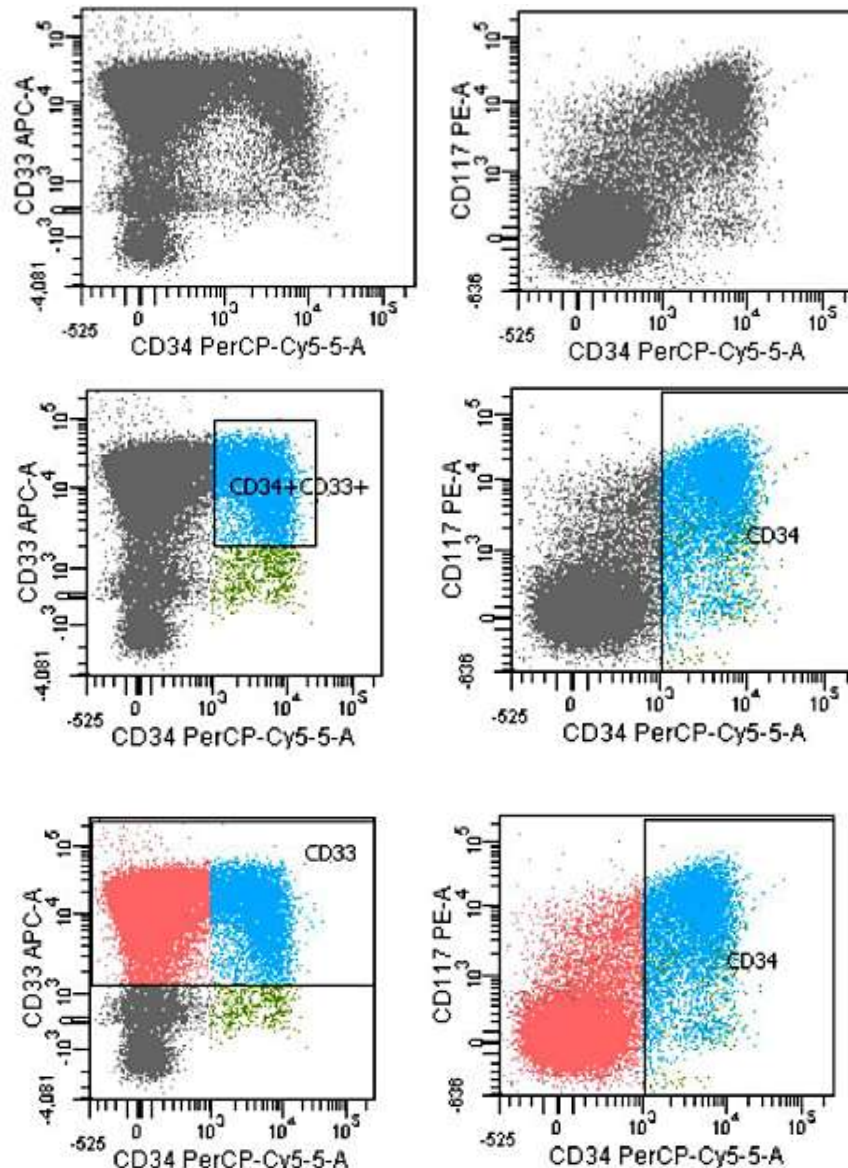


Όταν είναι σαφής ο διαχωρισμός του θετικού και αρνητικού τα αποτελέσματα είναι παρόμοια όποια από τις δύο στρατηγικές κι αν ακολουθήσουμε

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	35,350	###	100.0
CD45+	24,243	68.6	68.6
LYMPHS	4,690	19.3	13.3
CD3+	3,980	84.9	11.3
CD3+CD4+	2,629	56.1	7.4
CD3+CD8+	1,229	26.2	3.5
CD3-CD56+	374	8.0	1.1

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	35,350	###	100.0
CD45+	24,243	68.6	68.6
LYMPHS	4,690	19.3	13.3
CD3	3,988	85.0	11.3
CD4	2,699	57.5	7.6
CD8	1,321	28.2	3.7
CD3 AND CD4	2,645	56.4	7.5
CD3 AND CD8	1,229	26.2	3.5
NOT(CD3)	702	15.0	2.0
CD56	451	9.6	1.3
NOT(CD3) AND CD56	387	8.3	1.1

Ανάλυση με Ιεραρχική ή Boolean στρατηγική



-Η Boolean είναι καλύτερη στρατηγική οριοθέτησης όταν δεν είναι σαφής ο διαχωρισμός του θετικού και αρνητικού

Hierarchical gating

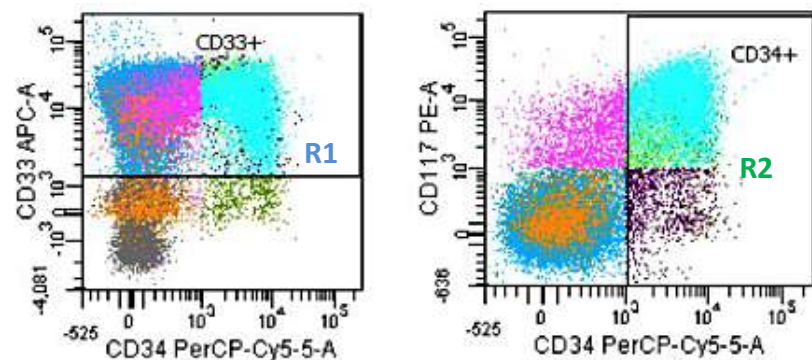
Tube: 15/117/34/38/33/45

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	56,695	####	100.0
SINGLETs	54,543	96.2	96.2
CD45	50,216	92.1	88.6
CD34	7,662	15.3	13.5
CD34+CD33+	6,898	13.7	12.2

Boolean gating

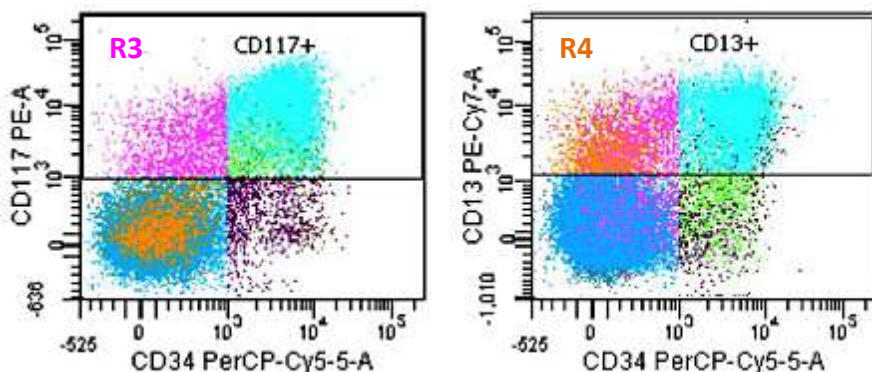
Tube: 15/117/34/38/33/45

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	56,695	####	100.0
SINGLETs	54,543	96.2	96.2
CD45	50,216	92.1	88.6
CD34	7,662	15.3	13.5
CD33	44,199	88.0	78.0
CD34 AND CD33	7,144	14.2	12.6



R1 AND R2

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	56,695	###	100.0
SINGLETs	54,543	96.2	96.2
CD45	50,216	92.1	88.6
CD34+	7,662	15.3	13.5
CD33+	44,137	87.9	77.8
CD117+	8,708	17.3	15.4
CD13+	9,127	18.2	16.1
CD34+ AND CD33+	7,143	14.2	12.6



R1 AND R2 AND R3

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	56,695	###	100.0
SINGLETs	54,543	96.2	96.2
CD45	50,216	92.1	88.6
CD34+	7,662	15.3	13.5
CD33+	44,137	87.9	77.8
CD117+	8,708	17.3	15.4
CD13+	9,127	18.2	16.1
CD34+ AND CD33+	7,143	14.2	12.6
CD34+ AND CD33+ AND CD117+	6,241	12.4	11.0

R1 AND R2 AND R3 AND R4

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	56,695	###	100.0
SINGLETs	54,543	96.2	96.2
CD45	50,216	92.1	88.6
CD34+	7,662	15.3	13.5
CD33+	44,137	87.9	77.8
CD117+	8,708	17.3	15.4
CD13+	9,127	18.2	16.1
CD34+ AND CD33+	7,143	14.2	12.6
CD34+ AND CD33+ AND CD117+	6,241	12.4	11.0
CD34+ AND CD33+ AND CD117+ AND CD13+	5,255	10.5	9.3

Ανάλογα με τον αριθμό των φθοριοχρωμάτων η εφαρμογή της Boolean στρατηγικής δίνει την δυνατότητα να μελετηθούν με μεγάλη λεπτομέρεια όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί των δεδομένων που θα προκύψουν από την ανάλυση.

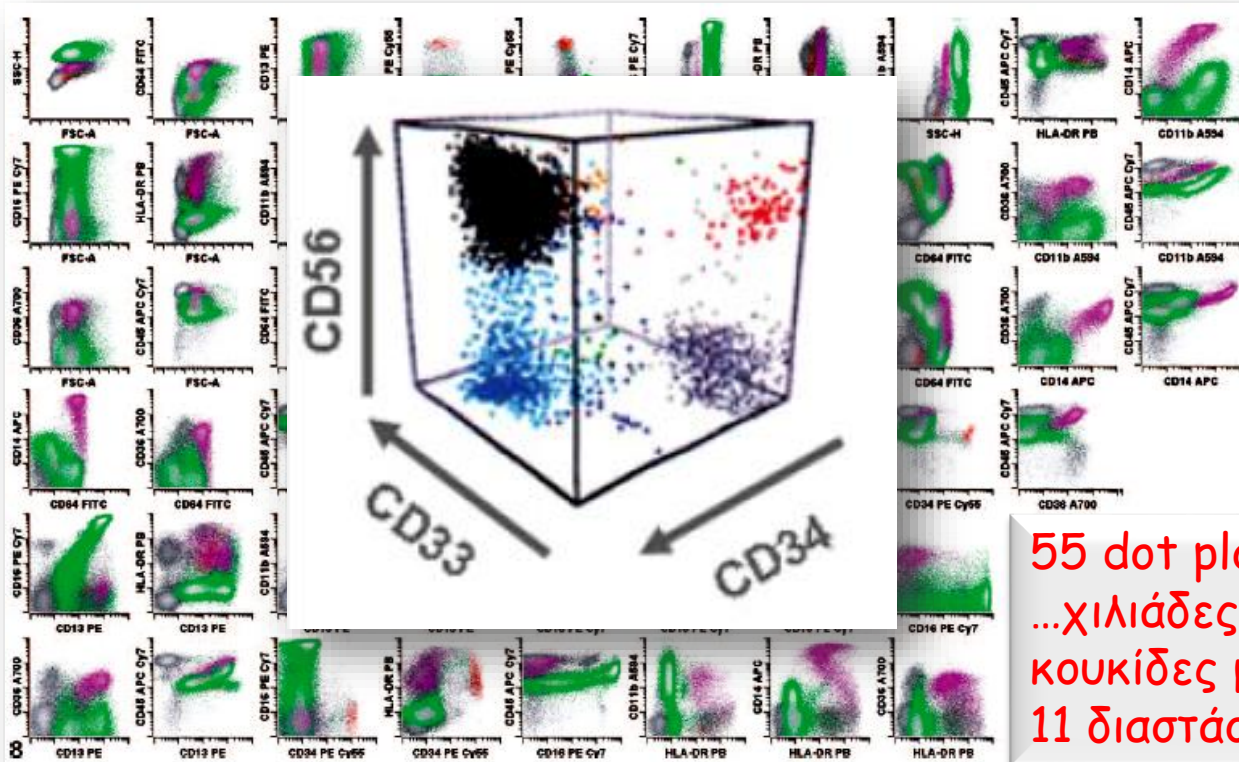
NOT R1 AND (R2 AND R3 AND R4)

κλπ...

Οριοθέτηση στην πολυχρωματική ανάλυση ?

Τα κυτταρομετρικά δεδομένα είναι πολυδιάστατα (multidimensional data) και όχι μονοδιάστατα (ιστογράμματα) ή δυσδιάστατα (dot plot)

Η χρησιμοποίηση 9 φθοριοχρωμάτων έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία...



55 dot plot !!
...χιλιάδες μοναδικές
κουκίδες μέσα σε χώρο
11 διαστάσεων !!!

Η πολυπλοκότητα των δεδομένων που προκύπτουν από την πολυχρωματική ανάλυση είναι πολύ δύσκολο να εκτιμηθεί στο σύνολο της με τις χρονοβόρες και υποκειμενικές στρατηγικές ανάλυσης που αναφέρθηκαν.

Πίνακας Boolean λογικής για ανοσοφαινότυπο με 4 φθοριοχρώματα μόνο...

R1 R2 R3 R4 Boolean κριτήριο

Ab1 Ab2 Ab3 Ab4

-	-	-	-	NOT (R1 OR R2 OR R3 OR R4)
+	-	-	-	R1 AND NOT (R2 OR R3 OR R4)
-	+	-	-	R2 AND NOT (R1 OR R3 OR R4)
+	+	-	-	R1 AND R2 AND NOT (R3 OR R4)
-	-	+	-	R3 AND NOT (R1 OR R2 OR R4)
+	-	+	-	R1 AND R3 AND NOT (R2 OR R4)
-	+	+	-	R2 AND R3 AND NOT (R1 OR R4)
+	+	+	-	R1 AND R2 AND R3 AND NOT R4
-	-	-	+	R4 AND NOT (R1 OR R2 OR R3)
+	-	-	+	R4 AND R1 AND NOT (R2 OR R3)
-	+	-	+	R4 AND R2 AND NOT (R1 OR R3)
+	+	-	+	R4 AND R2 AND R1 AND NOT R3
-	-	+	+	R4 AND R3 AND NOT (R1 OR R2)
+	-	+	+	R4 AND R3 AND R1 AND NOT R2
-	+	+	+	R4 AND R3 AND R2 AND NOT R1
+	+	+	+	R4 AND R3 AND R2 AND R1

Όσο αυξάνονται τα φθοριοχρώματα οι στρατηγικές ανάλυσης γίνονται πιο πολύπλοκες και χρονοβόρες, οι απεικόνιση τους πολύ σύνθετη για να είναι κατανοητή και τα στατιστικά δεδομένα που προκύπτουν πολύ υποκειμενικά για να μπορούν να οδηγήσουν σε συμπεράσματα που έχουν κλινική συσχέτιση

Κοινή γλώσσα στον τρόπο οριοθέτησης



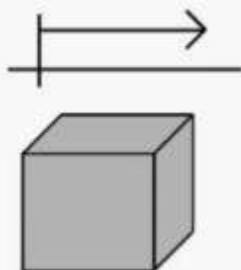
GATING-ML 2.0

International Society for Advancement of Cytometry (ISAC)
standard for representing gating descriptions in flow cytometry

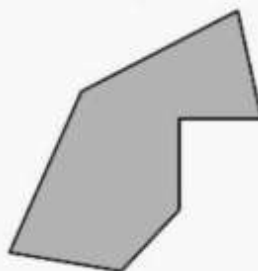
ISAC Data Standards Task Force

Version 2.0 – 2012-12-07

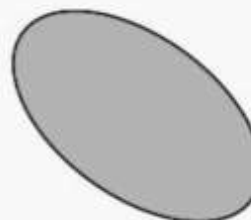
Rectangular Gate
(any number of dimensions)



Polygon Gate
(2 dimensions)



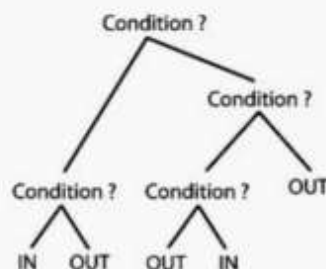
Ellipsoid Gate
(any number of dimensions)



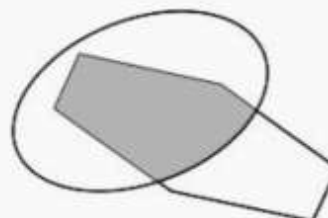
Polytope Gate
(any number of dimensions,
convex only)



Decision Tree Gate
(any number of dimensions)



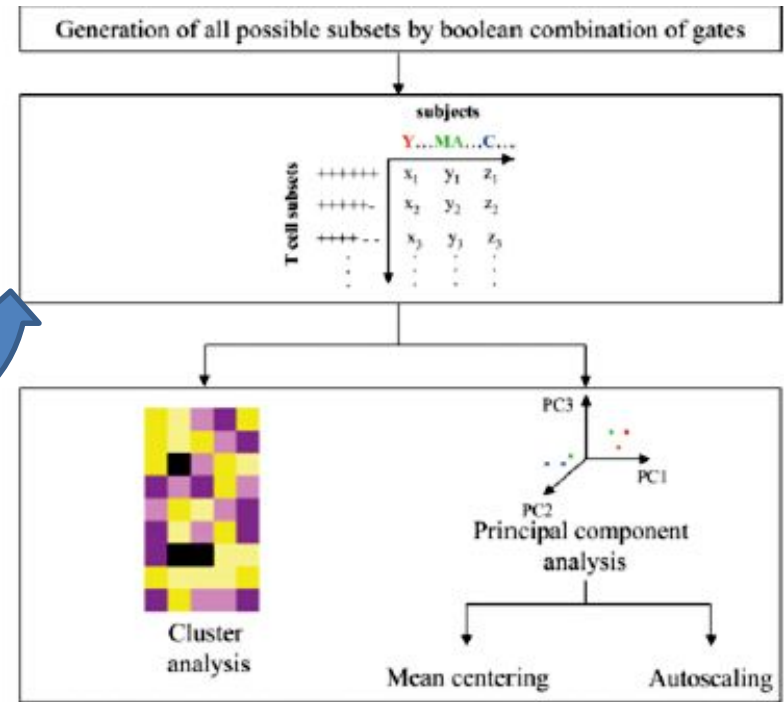
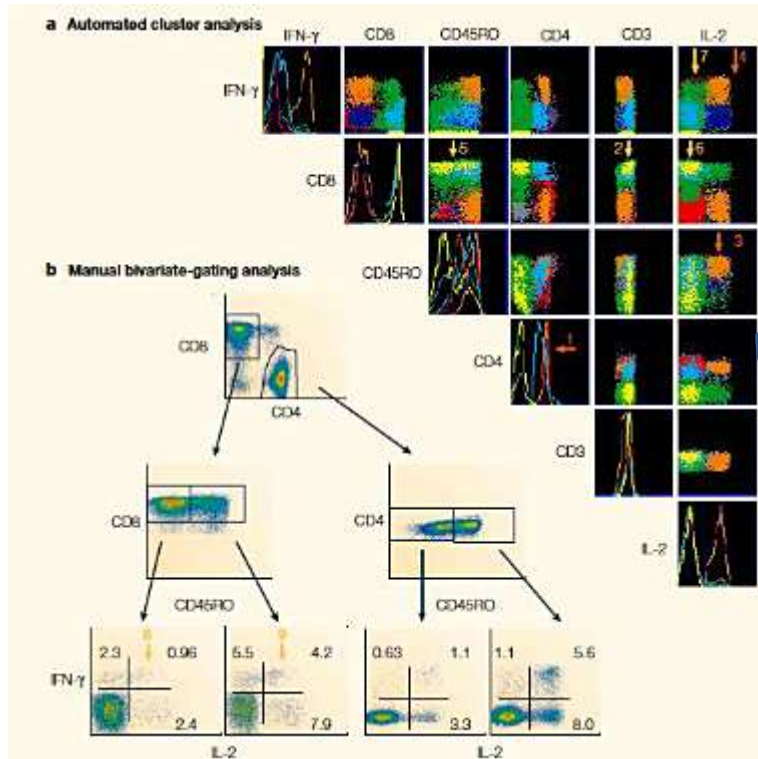
Boolean Gate
(any number of gates in
arbitrary dimensions)



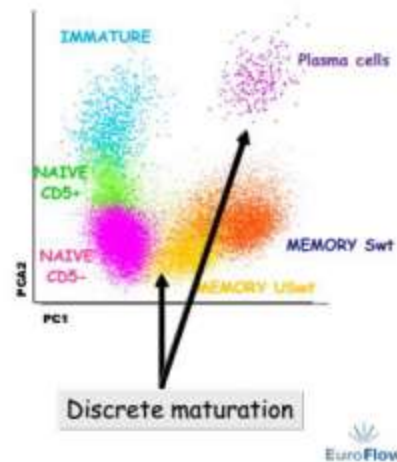
**..για
συγκρίσιμα
αποτελέσματα
και ασφαλή
συμπεράσματα**

Data Analysis in Flow Cytometry: The Future Just Started

Enrico Lugli¹, Mario Roederer¹, and Andrea Cossarizza²



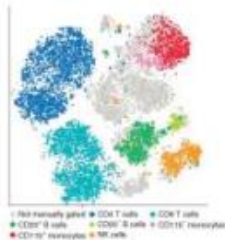
- Αναζήτηση νέων μεθόδων απεικόνισης των πολυδιάστατων δεδομένων
- Αυτοματοποίηση και προτυποποίηση των στρατηγικών ανάλυσης
- Εφαρμογή μεθόδων ταχύτερης και αποτελεσματικότερης επεξεργασίας του τεράστιου όγκου πληροφοριών που προκύπτουν από την πολυχρωματική ανάλυση.



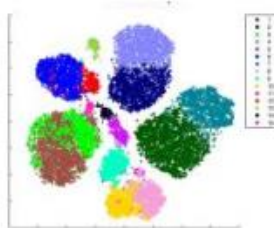
Examples of cyTOF analyses

FlowSOM: Self Organizing Maps

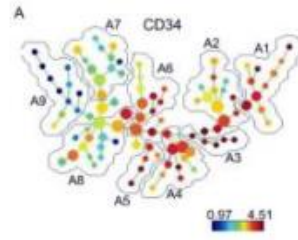
Sofie van Gassen et al. . *Cytometry A*. **87**, 636-645 (2015).



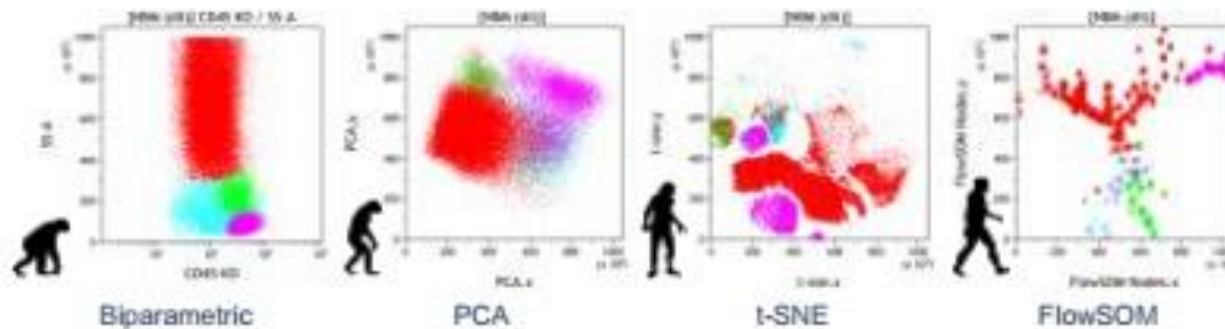
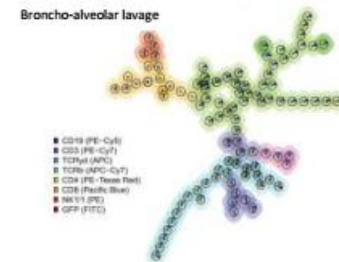
VISNE
Amir ED et al. 2013

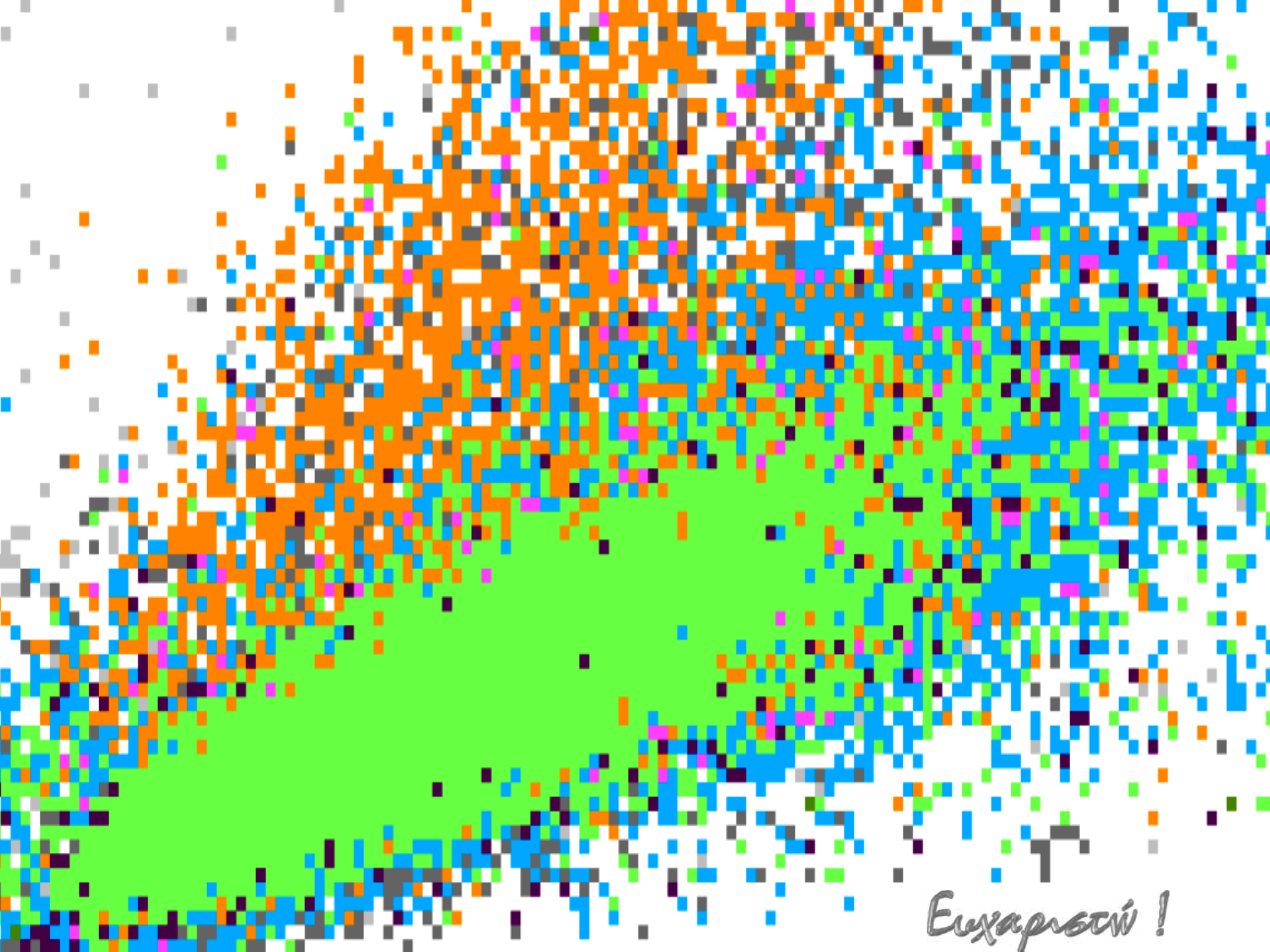


Phenograph
Levine J et al. 2015



SPADE
Han L et al. 2015





Euxapiscu !