

# **Ανοικτό Πανεπιστήμιο Κύπρου**

**Σχολή Θετικών και Εφαρμοσμένων Επιστημών**

**Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών:  
*Εφαρμοσμένη Πληροφορική της Υγείας και  
Τηλεϊατρική***

## **Μεταπτυχιακή Διατριβή**



**Επεξεργασία και ανάλυση εικόνων μικροσκοπίου**

**Fluorescent in Situ Hybridization (FISH)**

**Νικόλαος Νεοκλέους**

**Επιβλέπων Καθηγητής**

**Ζήνωνας Θεοδοσίου**

**Ιανουάριος 2018**

# **Ανοικτό Πανεπιστήμιο Κύπρου**

**Σχολή Θετικών και Εφαρμοσμένων Επιστημών**

**Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών:  
*Εφαρμοσμένη Πληροφορική της Υγείας και  
Τηλεϊατρική***

## **Μεταπτυχιακή Διατριβή**

**Επεξεργασία και ανάλυση εικόνων μικροσκοπίου**

**Fluorescent in Situ Hybridization (FISH)**

**Νικόλαος Νεοκλέους**

**Επιβλέπων Καθηγητής**

**Ζήνωνας Θεοδοσίου**

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή υποβλήθηκε προς μερική εκπλήρωση των απαιτήσεων για απόκτηση μεταπτυχιακού τίτλου σπουδών στον Νικόλαο Νεοκλέους από τη Σχολή Θετικών και Εφαρμοσμένων Επιστημών του Ανοικτού Πανεπιστημίου Κύπρου

**Ιανουάριος 2018**



## Περίληψη

Η τεχνική FISH (Fluorescent in Situ Hybridization-φθορίζων in situ υβριδισμός) αναπτύχθηκε τη δεκαετία του '80 και αποτελεί βασική μέθοδο στην Ιατρική επιστήμη με χρήση μικροσκοπίου για διάγνωση και αξιολόγηση μίας ασθένειας. Στην ουσία αποτελεί μοριακή κυτταρογενετική μέθοδο ελέγχου και εντοπισμού της παρουσίας ή απουσίας συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA στα χρωμοσώματα. Στηρίζεται στον υβριδισμό μιας αλληλουχίας «στόχου» (χρωμοσωμική περιοχή προς μελέτη) στη φυσική της θέση (in situ) και ενός μοριακού συνθετικού ανιχνευτή σεσημασμένου με φθορίζουσα ουσία (Theodosiou, et al., 2007 ). Παρόλο ότι η τεχνική FISH έχει πολλά πλεονεκτήματα η αυτόματη ανάλυση των παραγόμενων εικόνων αποτελεί πρόκληση. Δημιουργήθηκε η ανάγκη για εξοικονόμηση χρόνου και διαχείριση του μεγάλου όγκου εργασίας, για μείωση της διακύμανσης αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων ή/και παρατηρητών και για βελτίωση της παραγωγικότητας. Γι' αυτούς τους λόγους η διαδικασία αξιολόγησης εικόνων FISH οδήγησε την ερευνητική κοινότητα προς την κατεύθυνση δημιουργίας αυτόματων μεθόδων ανάλυσης με χρήση τεχνικών ψηφιακής επεξεργασίας εικόνας. Πρόσφατα ο προτεινόμενος συνδυασμός τρισδιάστατης μικροσκοπίας με τεχνικές ανακατασκευής εικόνας έχει διευρύνει τις εφαρμογές της τεχνικής οδηγώντας στη δημιουργία του 3D-FISH, το οποίο αποτέλεσε σημαντικό εργαλείο για την αποτύπωση της χωρικής διάταξης στοχευμένων αλληλουχιών γενετικού υλικού στον πυρήνα του κυττάρου (Yan, et al., 2009 ). Στόχος της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής είναι η παρουσίαση της βιβλιογραφίας εστιάζοντας στην αναλυτική μελέτη των τεχνικών που έχουν προταθεί για αυτόματη επεξεργασία και ανάλυση εικόνων FISH και στα διαγνωστικά εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν, στοχεύοντας με αυτό τον τρόπο στην τεκμηρίωση της αξίας που έχει στην καθημερινή πρακτική στην επιστήμη της Ιατρικής. Η αυτοματοποιημένη αξιολόγηση της εικόνας FISH είναι μια χρήσιμη τεχνολογία, με σαφείς ενδείξεις, που ακολουθεί τη ραγδαία εξέλιξη της τεχνολογίας, και θα πρέπει να υπάρχει σε κάθε εργαστήριο μοριακής κυτταρογενετικής.

## Summary

The cytogenetic technique FISH (Fluorescent in Situ Hybridization) was developed during 80s and become one of the basic methods that uses microscope in the field of Medicine for disease diagnosis and evaluation. It is a molecular cytogenetic technique to detect and localize the presence or absence of specific DNA sequences on chromosomes. FISH is based on the hybridization of a DNA sequence-target (chromosomal region of study) in its physical location (in situ) and the detection of fluorescent probes that bind to those parts of the chromosome (Theodosiou, et al., 2007 ). Despite the benefits of FISH technique, the automated analysis of the produced images is still a challenge. There is the need for time saving and for management of large volume of specimen, for reduction of interlaboratory and interobserver discrepancies and for improvement of productivity. For these reasons the procedure of FISH imaging processing and analysis has led the scientific community towards the development of automated methods of analysis by using digital techniques of imaging processing. Recently, the proposed combination of three-dimensional microscopy and image remodelling has expanded the technique applications leading to 3D-FISH, which become an important tool for the illustration of spatial arrangement of DNA targeted loci in cellular nucleus (Yan, et al., 2009 ). The goal of the present Master thesis is the presentation of the techniques used for the automated FISH image evaluation and the relative diagnostic tools, aiming in this way to the documentation of its value in everyday practice in the science of Medicine. The automated evaluation of FISH image is a useful technology, with clear indications, following the rapid evolution of technology, that there should be in each molecular cytogenetics laboratory.

Πρώτα απ' όλα, θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της μεταπτυχιακής εργασίας μου, Καθηγητή κ. Ζήνωνα Θεοδοσίου, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Επίσης, είμαι ευγνώμων στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής της μεταπτυχιακής διατριβής μου, Καθηγητές κ.κ. Θεόδωρο Κυπριανού και Νικόλαο Στυλιανίδη για την προσεκτική ανάγνωση της εργασίας μου και για τις πολύτιμες υποδείξεις τους. Οφείλω ευχαριστίες και στους υπόλοιπους Καθηγητές του τμήματος κ.κ. Μάριο Νεοφύτου, Θεοδόσιο Γούδα, Χαράλαμπο Μπαλή και Ευστάθιο Χ'δημητρίου που με υπομονή μου εξήγησαν έναν καινούριο για μένα τομέα, αυτόν της Πληροφορικής στην Υγεία. Θα ήταν παράβλεψη μου να μην στείλω τις θερμές μου ευχαριστίες στο εργαστηριακό τμήμα Κυτταρογενετικής του Γενικού Νοσοκομείου «Αρχιεπισκόπου Μακαρίου ΙΙΙ» για τη βοήθεια του τόσο στην κατανόηση της διαδικασίας προετοιμασίας του δείγματος όσο και για την ευγενική παραχώρηση εικόνων από δείγματα τους, αρχίζοντας από την υπεύθυνη του τμήματος κ.κ. Μαρία Λέρνη και συνεχίζοντας με τις κυτταρογενετιστές κ.κ. Στέλλα Κωνσταντίνου, Έλενα Γιάννου και Σοφία Νεοφύτου. Ευχαριστώ τους συμφοιτητές μου για την ηθική υποστήριξή τους. Επίσης, ευχαριστώ τους συναδέλφους μου Δρ. Χρυστάλλα Προκοπίου, Σωτήριο Κούμα και Ουρανία Σεϊμένη για την κατανόησή τους, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια των τελικών εξετάσεων και των τελευταίων μηνών της εκπόνησης της εργασίας. Πάνω απ' όλα, είμαι ευγνώμων στην γυναίκα μου Ελένη και στον γιο μου Νεοκλή για την ολόψυχη αγάπη και υποστήριξή τους στα φοιτητικά μου χρόνια.

Αφιερώνω αυτήν την μεταπτυχιακή διατριβή στην Ελένη και στον Νεοκλή.

Νικόλαος Νεοκλέους

# Περιεχόμενα

<b>Κεφάλαιο 1</b> .....	1
<b>Εισαγωγή</b> .....	1
1.1 Γενική ιδέα της μεθοδολογίας .....	2
1.2 Δομή μεταπτυχιακής διατριβής.....	4
<b>Κεφάλαιο 2</b> .....	5
<b>Τεχνική FISH και Εφαρμογές</b> .....	5
2.1 Προετοιμασία δείγματος .....	5
2.1.1 Εισαγωγή ανιχνευτών φθορισμού.....	6
2.2 Εφαρμογές τεχνικής FISH .....	9
2.2.1 Χρήση FISH για τον προσδιορισμό γονιδιακών θέσεων.....	9
2.2.2 Διάγνωση χρωμοσωμικών ανωμαλιών με καρυότυπο και FISH .....	11
2.2.3 Χρήση FISH ανιχνευτών για χρώση όλου του χρωμοσώματος .....	12
2.2.4 Χρήση FISH για την ανάλυση χρωμοσωμάτων σε μεσόφαση .....	13
2.2.5 Πρόσθετες εφαρμογές FISH στην κλινική και εργαστηριακή έρευνα..	14
<b>Κεφάλαιο 3</b> .....	16
<b>Ανάλυση εικόνας FISH</b> .....	16
3.1 Μη αυτόματη αξιολόγηση .....	16
3.2 Αυτόματη αξιολόγηση.....	19
3.2.1 Απαιτήσεις υλικού και λογισμικού της αυτόματης ανάλυσης δείγματος FISH.....	19
3.2.2 Διαδικασία εκπαίδευσης.....	22
3.2.3 Ακολουθία της ανάλυσης .....	23
3.2.4 Κατάτμηση μεμονωμένου πυρήνα .....	36
3.2.5 Κατάτμηση των κυτταρικών πυρήνων σε δείγματα ιστών.....	37
3.2.6 Ανίχνευση σήματος FISH .....	38
3.2.7 Αξιολόγηση σήματος .....	40
3.2.8 Χρόνος αξιολόγησης .....	41
<b>Κεφάλαιο 4</b> .....	43
<b>Εφαρμογές αυτόματης ανάλυσης</b> .....	43

4.1 Πρωτοπόρες εφαρμογές.....	43
4.2 Εύρος εφαρμογών .....	46
4.3 Αυτόματα συστήματα ανάλυσης εικόνων FISH .....	61
<b>Κεφάλαιο 5 .....</b>	<b>69</b>
<b>Συζήτηση.....</b>	<b>69</b>
5.1 Μελλοντικές προοπτικές .....	78
<b>Κεφάλαιο 6 .....</b>	<b>81</b>
<b>Επίλογος .....</b>	<b>81</b>
Βιβλιογραφία .....	85

## Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1: Διαδικασία παρασκευής FISH.....	7
Εικόνα 2: Ανάλυση FISH.....	10
Εικόνα 3: Παράδειγμα απεικόνισης μετατόπισης (11;19) με FISH .....	11
Εικόνα 4: Παράδειγμα φασματικού καρυότυπου .....	12
Εικόνα 5: Ανάλυση FISH σε μεσόφαση.....	14
Εικόνα 6: Παράδειγμα συγκριτικού υβριδισμού γονιδιώματος.....	15
Εικόνα 7: Παράδειγμα αποτελέσματος FISH από το κυτταρογενετικό εργαστήριο του ΓΝ «Αρχιεπισκόπου Μακαρίου ΙΙΙ» .....	17
Εικόνα 8: Αλγόριθμος ανάλυσης εικόνας FISH κατά Netten, et al., (Netten, et al., 1997) .....	25
Εικόνα 9: Ανάλυση εικόνας 3D FISH κατά Gué (Gué, et al., 2005) .....	27
Εικόνα 10: Κατάτμηση κυττάρων σε μικροβιακό πληθυσμό.....	28
Εικόνα 11: Χρήση αλγόριθμου watershed για την κατάτμηση μικροβιακών κυττάρων.....	29
Εικόνα 12: Εικόνες φυσιολογικής και λανθασμένης ερμηνείας λόγω λάθους στην αναγνώριση του σήματος .....	30
Εικόνα 13: Παράδειγμα QFISH.....	33
Εικόνα 14: Ανάλυση εικόνα κατά Rygiel et al (Rygiel, et al., 2007) .....	48
Εικόνα 15: Πολυπλοειδία .....	48
Εικόνα 16: Εφαρμογή ανάλυσης εικόνας FISH σε δείγμα μικροσυστοιχίας.....	49
Εικόνα 17: Παράδειγμα φυσιολογικών και μη κυττάρων θυρεοειδούς.....	51

Εικόνα 18: Αυτόματη ανάλυση δείγματος τραχήλου μήτρας .....	52
Εικόνα 19: Ανάλυση δειγμάτων από λεμφώματα Β κυτταρικής αρχής .....	52
Εικόνα 20: Παράδειγμα πολυπλοειδίας σε λεμφοβλάστες .....	53
Εικόνα 21: Εξέταση αμνιακού υγρού για τρισωμία 21 (Down syndrome) .....	55
Εικόνα 22: Ταυτοποίηση κυττάρων με τρισωμία 21 σε δείγματα τραχήλου της μήτρας.....	56
Εικόνα 23: Ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων από δείγματα αίματος ασθενών και καρκίνο εντέρου και ωοθηκών.....	57
Εικόνα 24: Συσχέτιση μορφολογίας με FISH ανάλυση.....	58
Εικόνα 25: Συνδυασμός ανοσοφαινότυπου με FISH.....	59
Εικόνα 26: Αποτελεσματική αυτόματη αναγνώριση κυττάρων σε δείγμα χρώματος .....	60
Εικόνα 27: Χρήση συστήματος BioView σε δοκιμασία χιμαιρισμού .....	63
Εικόνα 28: Εφαρμογή συστήματος GenASIs .....	64
Εικόνα 29: Εφαρμογή συστήματος D-sight.....	66
Εικόνα 30: Εφαρμογή συστήματος iconoscope .....	67
Εικόνα 31: Προσφορά αυτόματου συστήματος καταμέτρησης σπέρματος σε αμερικάνικη εταιρεία .....	80

## Περιεχόμενα διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Βιβλιογραφική αναζήτηση- Αριθμός άρθρων ανάλογα με τις λέξεις κλειδιά.....	3
Διάγραμμα 2: Στάδια αυτόματης ανίχνευσης 3D σημείων κατά Ram et al (Ram, et al., 2012) .....	35
Διάγραμμα 3: Συσχέτιση αποτελεσμάτων συστήματος GenASIs (κάθετος άξονας) με μη-αυτόματη μέθοδο (οριζόντιος άξονας).....	65
Διάγραμμα 4: Αρθρογραφία από το 1980 ως σήμερα.....	72

## Περιεχόμενα πινάκων

Πίνακας 1: Συσχέτιση αυτόματης μεθόδου Metafer με συμβατική μέθοδο..... 62

Πίνακας 2: Συγκριτικά αποτελέσματα κατά Smith et al (Smith & Bentz, 2010). 63

Πίνακας 3: Ουσιώδεις προδιαγραφές για την προτυποποίηση των αυτόματων συστημάτων ..... 76

Πίνακας 4: Χρήσιμες επιπρόσθετες πληροφορίες για τα αυτόματα συστήματα 77

# Κεφάλαιο 1

## Εισαγωγή

---

Ο μεσοφασικός φθορίζων *in situ* υβριδισμός (i-FISH) είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την απεικόνιση διαφόρων μοριακών στόχων σε μη-πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα και ανίχνευση γενετικών ανωμαλιών. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας του υβριδισμού, ειδικοί στοχευμένοι ανιχνευτές δεσμεύονται σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος. Βάσει της ακολουθίας των συγκεκριμένων στόχων, οι ανιχνευτές συχνά ταξινομούνται σε τρεις κύριες ομάδες:

- (i) επαναληπτική ακολουθία ανιχνευτών (πχ, ανιχνευτές αρίθμησης κεντρομεριδίου—CEP και ανιχνευτές τελομεριδίου),
- (ii) μοναδική ακολουθία ανιχνευτών (ανιχνευτές ειδικοί συγκεκριμένων τόπων—LSI), και
- (iii) ανιχνευτές χρώσης χρωμοσωμάτων. Αυτοί οι γλυκοφωσφορικοί ή 2-αμινο-αιθυλ-γλυκερινικοί δομικοί ανιχνευτές ονομάζονται DNA ή RNA ανιχνευτές και επισημαίνονται με φθορίζουσες χρωστικές ουσίες σε μία ή πολλαπλές αποχρώσεις και διαβαθμίσεις, και ως εκ τούτου, μπορούν να απεικονιστούν και να ανιχνευτούν ως φθορίζοντα σήματα (κηλίδες) σε μιτωτικούς πυρήνες.

Η τεχνική FISH έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με συμβατική κυτταρογενετική ανάλυση (Kearney, 2001), (Lindsay & David, 2007), (Ventura, et al., 2006), (Vorsanova, et al., 2010):

- (i) δεν είναι απαραίτητη η καλλιέργεια κυττάρων, έτσι μπορεί να εφαρμοστεί στην ανάλυση οποιονδήποτε κυτταρολογικών και ιστολογικών δειγμάτων. Παράλληλα η διαδικασία επιλογής κλώνου

και ο χαμηλός μιτωτικός δείκτης δεν οδηγούν σε παρερμηνεία των αποτελεσμάτων,

- (ii) είναι δυνατή η ανίχνευση ανωμαλιών που παραμένουν κρυμμένες στο συμβατικό καρυότυπο,
- (iii) γενετικές πληροφορίες μπορούν να συσχετιστούν με μορφολογικά, φαινοτυπικά και τοπογραφικά γνωρίσματα σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου.

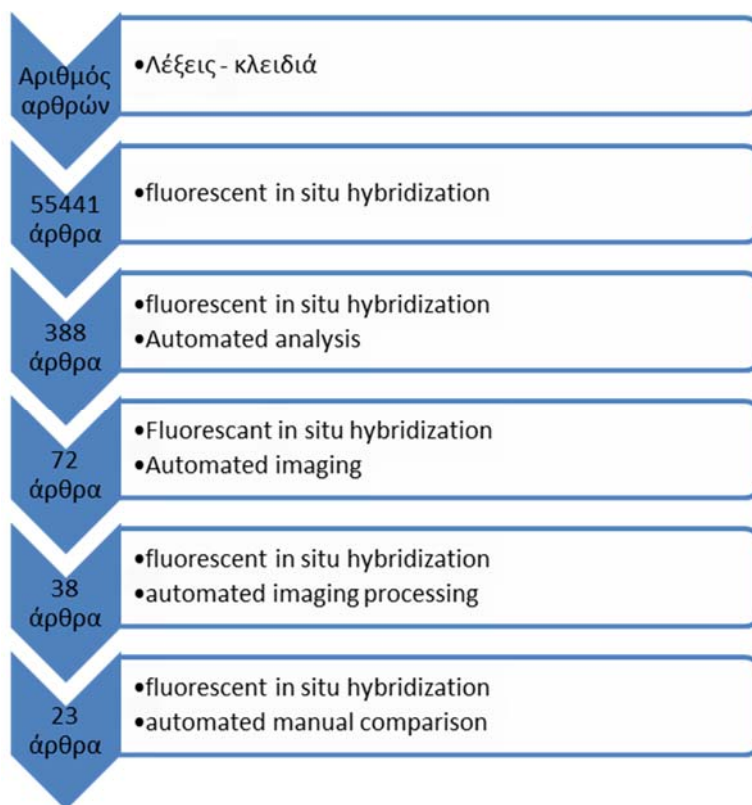
Η μη-αυτόματη αξιολόγηση των FISH σημάτων είναι μια διαδικασία δύσκολη, χρονοβόρα και επιρρεπής σε λάθη που στηρίζεται στην υποκειμενική ερμηνεία. Η αυτοματοποιημένη αξιολόγηση των σημάτων παρέχει τη δυνατότητα να ξεπεραστούν αυτές οι δυσκολίες. Η πρώτη ανακοίνωση για αυτοματοποιημένη FISH ανάλυση έχει δημοσιευθεί πριν από 30 χρόνια και από τότε έχουν εισαχθεί αρκετές εφαρμογές στους τομείς της ογκολογίας, της βιολογίας του προγεννητικού ελέγχου και του ελέγχου γονιμότητας.

Η τεχνολογία της ανάλυσης και επεξεργασίας εικόνας FISH είναι ένα πεδίο ραγδαίας ανάπτυξης που αποτελεί πόλο έλξης πολλών εμπειρογνομόνων της επιστήμης της Πληροφορικής που ασχολούνται με την απεικόνιση βιολογικών δειγμάτων. Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η βιβλιογραφική ανασκόπηση και η ανάλυση των σχετικών δημοσιευμένων άρθρων στοχεύοντας στην παρουσία των τεχνικών που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση εικόνων FISH. Πρέπει να σημειωθεί ότι η εργασία εκτός της παρουσίασης των πιο σύγχρονων τεχνικών και εφαρμογών συμπεριλαμβάνει κυρίως το τρόπο με τον οποίο η κάθε τεχνική επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα στην αποτύπωση της εικόνας και τι αντίκτυπο έχει αυτή η απεικόνιση στην καθημερινή πρακτική της Ιατρικής επιστήμης.

## 1.1 Γενική ιδέα της μεθοδολογίας

Για τη συγγραφή της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής χρησιμοποιήθηκε όλη η υπάρχουσα προσβάσιμη βιβλιογραφία που υπάρχει στο διαδίκτυο, δηλαδή τη διαδικτυακή βιβλιοθήκη pubmed όσο και τη Google scholar μαζί με την

πανεπιστημιακή βιβλιοθήκη MyAthens.. Οι λέξεις κλειδιά που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: «FISH», «automated», «imaging», «processing», «analysis», «comparison». Αναζητώντας άρθρα για την τεχνική FISH βρέθηκαν αρχικά 55441 άρθρα τα οποία περιορίστηκαν σε αυτά που αναφέρονται στη βιβλιογραφία χρησιμοποιώντας συνδυασμό με λέξεις κλειδιά (διάγραμμα 1). Για την εκπόνηση της εργασίας χρησιμοποιήθηκε συγκερασμός πολλών επιλεγμένων άρθρων. Επίσης θα πρέπει να τονιστεί ότι πλέον επειδή η τεχνική FISH γίνεται κυρίως σε κύτταρα που βρίσκονται στη μεσόφαση, για λόγους κατανόησης και αποφυγής σύγχυσης, στην παρούσα εργασία θα χρησιμοποιείται μόνο η λέξη «FISH» αντί της «i-FISH»



Διάγραμμα 1: Βιβλιογραφική αναζήτηση- Αριθμός άρθρων ανάλογα με τις λέξεις κλειδιά

Μελετώντας τη βιβλιογραφία, διαπιστώνεται ότι η έκφραση «αυτοματοποιημένη FISH ανάλυση» χρησιμοποιείται επίσης σε άρθρα που περιγράφουν αυτοματοποιημένες διαδικασίες επεξεργασίας του δείγματος. Παρακάτω, παρέχονται αυτές οι τεχνικές με ειδική επισήμανση σε θέματα που

αφορούν την αποτελεσματικότητα ενός αυτοματοποιημένου FISH σταθμού εργασίας.

## 1.2 Δομή μεταπτυχιακής διατριβής

Στο πρώτο κεφάλαιο παρουσιάζεται η τεχνική FISH και οι βασικές εφαρμογές της ενώ παραδείγματα της κάθε εφαρμογής περιγράφονται στο δεύτερο κεφάλαιο. Στο τρίτο κεφάλαιο αναφέρεται η μη-αυτόματη τεχνική FISH και θα αναλύονται λεπτομερώς οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται κατά τη διαδικασία της αυτόματης ανάλυσης εικόνων FISH παρουσιάζοντας παραδείγματα που αποτυπώνουν τη χρησιμότητα στην Ιατρική πρακτική, τόσο στο διαγνωστικό όσο και στον ερευνητικό τομέα. Στο τέταρτο κεφάλαιο παρουσιάζονται χαρακτηριστικά παραδείγματα των εφαρμογών της αυτόματης ανάλυσης FISH. Μέσα από τα παραδείγματα αυτά αναδεικνύεται η σημαντικότητα της χρήσης αυτόματης επεξεργασίας και ανάλυσης εικόνων FISH στη διάγνωση, σταδιοποίηση μίας νόσου, έρευνα, και παρακολούθηση αποτελέσματος της θεραπείας. Στο ίδιο επίσης κεφάλαιο αναφέρονται παραδείγματα συστημάτων αυτόματης επεξεργασίας και ανάλυσης εικόνων FISH που είναι διαθέσιμα στο εμπόριο. Στο πέμπτο κεφάλαιο αναλύονται τα πλεονεκτήματα της αυτόματης επεξεργασίας και ανάλυσης εικόνων FISH καθώς επίσης και τα ουσιώδη εμπόδια που δεν αφήνουν την επέκταση της χρήσης της. Παράλληλα παρουσιάζονται οι απαραίτητες πληροφορίες και χαρακτηριστικά ενός συστήματος αυτόματης επεξεργασίας και ανάλυσης εικόνων FISH και επισημαίνεται η ανάγκη της προτυποποίησης και της δημιουργίας πρωτοκόλλων για όλα τα στάδια αυτής. Τέλος, το έκτο κεφάλαιο συνοψίζει τη μεταπτυχιακή διατριβή και παρουσιάζει μελλοντικές προεκτάσεις.

# Κεφάλαιο 2

## Τεχνική FISH και Εφαρμογές

---

Στο παρόν κεφάλαιο θα περιγραφθεί η διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος για τη τεχνική FISH και θα αναφερθούν οι κυριότερες εφαρμογές στην επιστήμη υγείας. Σημαντική εφαρμογή της τεχνικής FISH είναι ο προσδιορισμός αριθμητικών διαταραχών που αφορούν είτε σε απώλεια είτε σε αύξηση του αριθμού αντιγράφων ενός χρωμοσώματος. Ορισμένες αριθμητικές ανωμαλίες φαίνεται ότι σχετίζονται σταθερά με συγκεκριμένους τύπους νεοπλασμάτων και αποτελούν βασικό συστατικό της προκαλούμενης ανευπλοειδίας του DNA, η οποία μπορεί να έχει σημαντική προγνωστική αξία. Αριθμητικές ανωμαλίες στα χρωματοσώματα 13, 18 και 21, συνήθως με τη μορφή της τρισωμίας, χαρακτηρίζουν τα σύνδρομα Patau, Edward και Down αντίστοιχα και αποτελούν σημαντικές εφαρμογές προγεννητικού ελέγχου που μπορούν να απαντηθούν ταχύτατα με τη μέθοδο FISH μεσοφασικών κυττάρων. Το δεύτερο είδος εφαρμογών της τεχνικής FISH είναι οι δομικές χρωματοσωματικές διαταραχές, οι οποίες μπορούν να ανιχνευθούν με τη χρήση δεικτών έναντι μιας ή περισσότερων ειδικών χρωματοσωματικών αλληλουχιών.

### 2.1 Προετοιμασία δείγματος

Δείγμα υψηλής ποιότητας αποτελεί προϋπόθεση για την αποτελεσματική και αξιόπιστη έρευνα. Οι Pardue και Gall, οι εφευρέτες της τεχνικής του *in situ* υβριδισμού, είχαν ήδη επιστήσει την προσοχή στη βασική τεχνική πρόκληση προετοιμασίας του δείγματος: μετουσιώνοντας το κυτταρικό DNA χωρίς να καταστρέφεται η μορφολογία του (Pardue & Gall, 1969). Οι δύο επιστήμονες δημοσίευσαν ένα ορόσημο άρθρο αποδεικνύοντας ότι ραδιενεργά αντίγραφα μιας ριβοσωμικής ακολουθίας DNA θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση συμπληρωματικών ακολουθιών DNA στον πυρήνα ενός αυγού βατράχου. Από τις αρχικές παρατηρήσεις, πολλές βελτιώσεις έχουν αυξήσει την

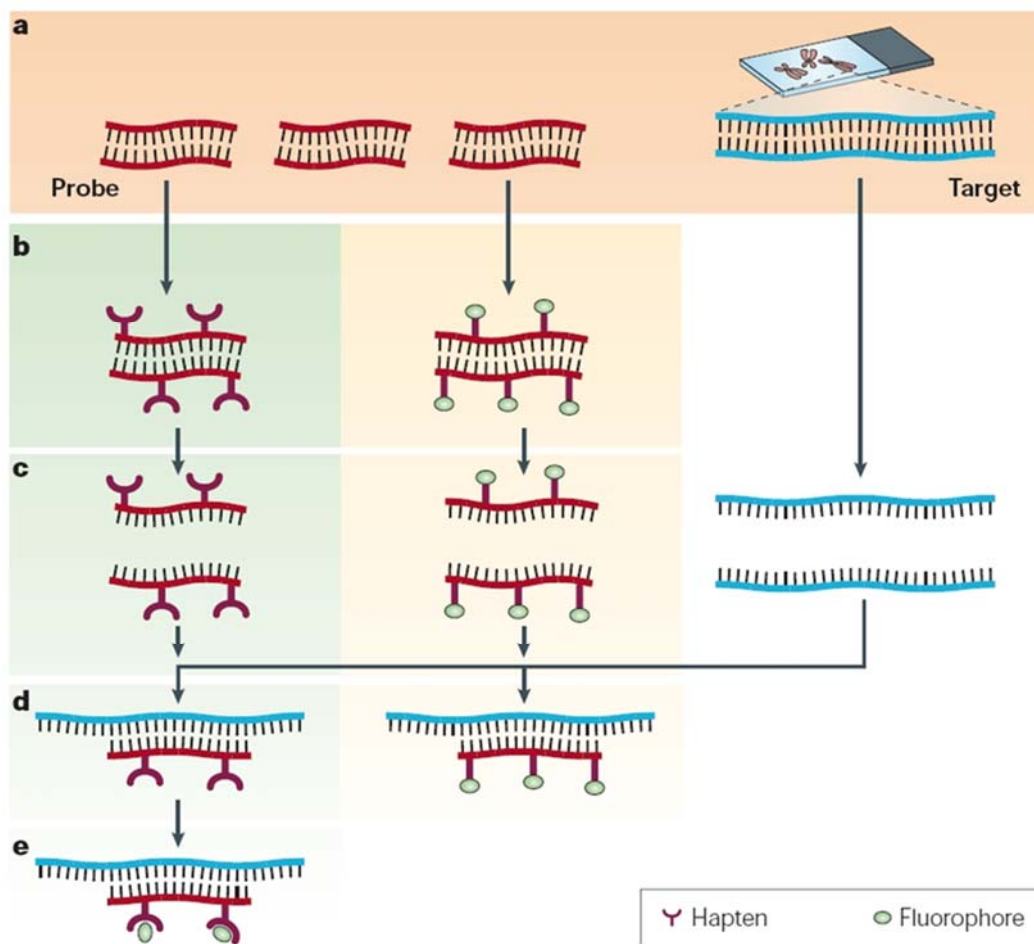
ευελιξία και την ευαισθησία της διαδικασίας στο βαθμό που ο *in situ* υβριδισμός θεωρείται πλέον απαραίτητο εργαλείο στην κυτταρογενετική.

### 2.1.1 Εισαγωγή ανιχνευτών φθορισμού

Σύντομα μετά από την εργασία των Gall και Pardue, φθορίζουσες ουσίες-ετικέτες έχουν αντικαταστήσει γρήγορα τις ραδιενεργές ουσίες σαν ανιχνευτές υβριδισμού εξαιτίας της μεγαλύτερης ασφάλειας, σταθερότητας και ευκολίας της ανίχνευσης τους (Rudkin & Stollar, 1977). Στην πραγματικότητα, ο πιο τρέχον *in situ* υβριδισμός γίνεται χρησιμοποιώντας διαδικασίες FISH (Speicher & Carter, 2005), (Trask, 2002). Η ανίχνευση μιας ακολουθίας DNA είναι σαν να ψάχνεις «βελόνα στα άχυρα», παίρνοντας σαν «βελόνα» την αλληλουχία του DNA και σαν «άχυρα» το σύνολο χρωμοσωμάτων. Αυτή η αναζήτηση γίνεται πολύ ευκολότερη εάν ο ερευνητής έχει ένα ισχυρό «μαγνήτη»— στην περίπτωση αυτή, μία φθορίζουσα ουσία που αποτελεί αντίγραφο της υπό εξέτασης ακολουθίας του DNA. Υβριδοποίηση παρουσιάζεται όταν ο «μαγνήτης» συναντά τη «βελόνα»; Αυτό απαιτεί τόσο έναν ανιχνευτή όσο και έναν στόχο, όπως φαίνεται στο εικόνα 1 (Speicher & Carter, 2005). Στη συγκεκριμένη εικόνα η ακολουθία του ανιχνευτή, συχνά ένα κομμάτι κλωνοποιημένου DNA, απεικονίζεται με κόκκινο. Ο στόχος-αλληλουχία DNA — χρωμοσώματα σε μια αντικειμενοφόρο — απεικονίζεται με μπλε χρώμα (στη δεξιά στήλη της εικόνας). Υδρογονικοί δεσμοί ενώνουν τα δύο σκέλη της έλικας του DNA και αντιπροσωπεύονται με μαύρες γραμμές.

Πριν από την υβριδοποίηση, ο ανιχνευτής DNA σημαίνεται με διάφορα μέσα, όπως μετάφραση εγκοπών, τυχαία εκλεκτική σήμανση, και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Δύο είναι οι πιο διαδεδομένες στρατηγικές σήμανσης που χρησιμοποιούνται συνήθως: η έμμεση σήμανση (αριστερή στήλη) και άμεση σήμανση (δεξιά στήλη). Στην πρώτη, οι ανιχνευτές σημαίνονται με τροποποιημένα νουκλεοτίδια που περιέχουν απτίνη, ενώ στη δεύτερη χρησιμοποιούνται νουκλεοτίδια που έχουν τροποποιηθεί άμεσα και περιέχουν φθοροφόρα ουσία. Κατόπιν ο σημασμένος ανιχνευτής και η υπό εξέταση

αλληλουχία του DNA μετουσιώνονται, με θέρμανση ή χημικές ουσίες, και διαχωρίζονται. Συνδυάζοντας τον μετουσιωμένο ανιχνευτή και στόχο-αλληλουχία επιτρέπεται η ανάπτυξη συμπληρωματικής ακολουθίας DNA, αφού νέοι υδρογονικοί δεσμοί δημιουργούνται. Αν ο ανιχνευτής έχει σημανθεί έμμεσα, ένα επιπλέον βήμα απαιτείται για την απεικόνιση της μη φθορίζουσας απτίνης χρησιμοποιώντας ένα ενζυματικό ή ανοσολογικό σύστημα ανίχνευσης. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το FISH είναι πιο γρήγορα με άμεση σήμανση ανιχνευτών, η έμμεση σήμανση προσφέρει το πλεονέκτημα της ενίσχυσης σήματος χρησιμοποιώντας διάφορα στρώματα αντισωμάτων, και ως εκ τούτου, μπορεί να παράγει ένα σήμα που να είναι φωτεινότερο σε σύγκριση με το φόντο της εικόνας (Speicher & Carter, 2005).



Εικόνα 1: Διαδικασία παρασκευής FISH

Όταν οι ερευνητές σχεδιάζουν ένα πείραμα με FISH, χρειάζεται να εξετάσουν κατά πόσο η ευαισθησία και η ευκρίνεια που απαιτούνται για το πείραμα βρίσκονται εντός των τεχνικών ορίων της μικροσκοπησης με φθορισμό. Η ευαισθησία εξαρτάται από την ικανότητα συγκέντρωσης φωτός στο συγκεκριμένο μικροσκόπιο, που καθορίζει κατά πόσο μικρές αλληλουχίες στόχοι, οι οποίες είναι δυσκολότερο ορατές από τις μεγάλες αλληλουχίες στόχους, μπορούν να ανιχνευθούν. Η ευκρίνεια αναφέρεται στην ικανότητα διάκρισης μεταξύ δύο σημείων κατά μήκος ενός χρωμοσώματος. Ιδανικά, με το οπτικό μικροσκόπιο μπορείς να διαχωρίσεις αντικείμενα που απέχουν το λιγότερο από 200 – 250 nm, το οποίο αποτελεί το ελάχιστο όριο του ορατού φάσματος. Με αυτά τα τεχνικά όρια, οι ερευνητές πρέπει επίσης να εξετάσουν τη διάπλαση του DNA εντός του χρωμοσώματος. Τα χρωμοσώματα στη φάση της αντιγραφής είναι δέκα φορές πιο συμπυκνωμένα από ότι το κοινό DNA ενώ στη μετάφαση είναι εκατό φορές πιο πυκνά. Επομένως οι ερευνητές αναμένουν μεγαλύτερη ευκρίνεια επεξεργάζοντας χρωμοσώματα στη φάση της αντιγραφής όπου το γενετικό υλικό είναι πιο ξεδιπλωμένο και οι υπό μελέτη αλληλουχίες απέχουν περισσότερο, πράγμα που τις κάνει πιο ορατές (Rajor, et al., 2012a).

Για να παραχθούν φωτεινά σήματα, είναι απολύτως απαραίτητο ένα πρωτόκολλο επεξεργασίας δείγματος προσεκτικά βελτιστοποιημένο και τυποποιημένο. Έτσι μπορεί να αποφευχθούν λάθη στη διαδικασία όπως, η συζευγμένη μετουσίωση με προηγηθείσα επώαση με πρωτεάση με υψηλές θερμοκρασίες ή με χημικούς παράγοντες είναι μία επιθετική διαδικασία που μπορεί να προκαλέσει αλλοιώσεις στο DNA που πιθανόν θα οδηγήσουν σε λανθασμένη εντύπωση απουσίας φωτεινού σημείου FISH. Αυτό το ανεπιθύμητο φαινόμενο μπορεί να είναι ακόμη πιο έντονο στην περίπτωση που έχει προηγηθεί ακατάλληλη δειγματοληψία ή κακή μονιμοποίηση. Πρόσθετα του γεγονότος ότι η μηχανικά υποβοηθούμενη αξιολόγηση απαιτεί άθικτο στόχο για τη δημιουργία υψηλής έντασης σήματα στο FISH με χαμηλή μεταβλητότητα, το επίπεδο της συμπύκνωσης της χρωματίνης είναι επίσης ζωτικής σημασίας. Έτσι, υπερβολικά αποσυμπυκνωμένη χρωματίνη, λόγω παραδείγματος χάρη μακράς διάρκειας μετουσίωσης, μπορεί να οδηγήσει σε νηματοειδή σήματα που να

εμποδίζουν την αποτελεσματική αυτοματοποιημένη ανίχνευσης τους (Pajor, et al., 2012a).

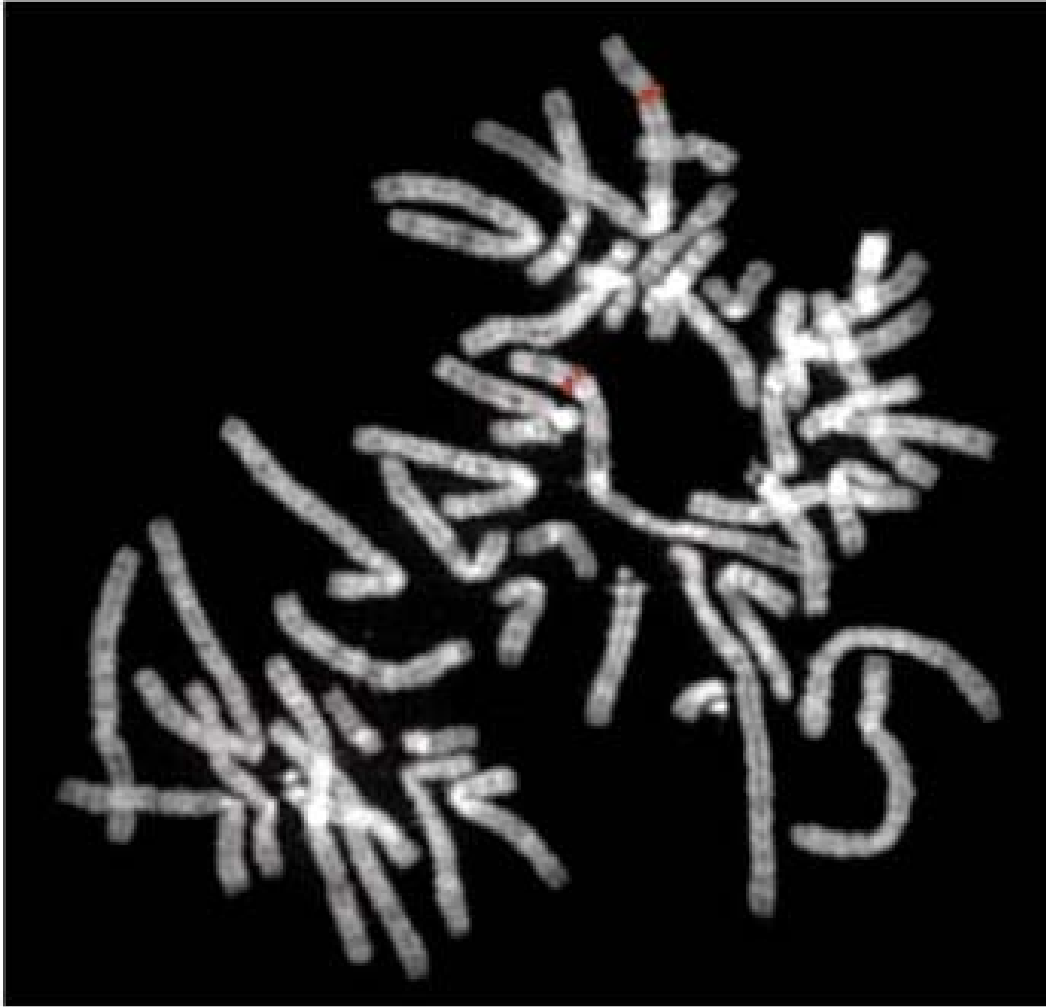
## 2.2 Εφαρμογές τεχνικής FISH

Η τεχνική FISH χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των γονιδιακών θέσεων, για τη διάγνωση χρωμοσωμικών ανωμαλιών και για τη μελέτη της ολότητας του χρωμοσώματος με χρήση διαφόρων χρωμάτων. Η τεχνική FISH έχει το μοναδικό χαρακτηριστικό ότι μπορεί να γίνει στη μεσόφαση του κυττάρου, χωρίς δηλαδή αυτό να μπει στη διαδικασία του πολλαπλασιασμού. Επιπλέον η τεχνική FISH μπορεί να συνδυαστεί με πληθώρα άλλων μοριακών και γενετικών τεχνικών δίνοντας εντυπωσιακά λεπτομερή αποτελέσματα.

### 2.2.1 Χρήση FISH για τον προσδιορισμό γονιδιακών θέσεων

Το FISH παρέχει ένα ισχυρό εργαλείο για τον προσδιορισμό της θέσης μίας κλωνοποιημένης ακολουθίας DNA χρωμοσωμάτων σε φάση μετάφασης. Στην εικόνα 2 φαίνονται τα αποτελέσματα μίας εξέτασης FISH. Διακρίνουμε με κόκκινο χρώμα την φθορίζουσα ουσία που χρησιμοποιήθηκε για να στοχεύσει συγκεκριμένη γονιδιακή θέση (Cheung, et al., 2001).

Οι κόκκινες λωρίδες εντοπίζονται σε περιοχές υβριδοποίησης σε δύο ομόλογα χρωμοσώματα, τα οποία μπορεί να προσδιοριστούν από τα χαρακτηριστικά μορφολογικά τους μοτίβα. Μια προσεκτικότερη εξέταση δείχνει ότι κάθε κόκκινη λωρίδα αποτελείται στην πραγματικότητα από δύο σημεία, αντιπροσωπεύοντας τις δύο αδερφές χρωματίδες ενός χρωμοσώματος σε μίτωση. Ένας εξειδικευμένος κυτταρογενετιστής θα είναι σε θέση να χρησιμοποιήσει τα δεδομένα αυτά του υβριδισμού μαζί με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά για να τοποθετήσει την ακολουθία του ανιχνευτή μέσα σε λίγες μεταφάσεις των άλλων γνωστών γονιδίων.

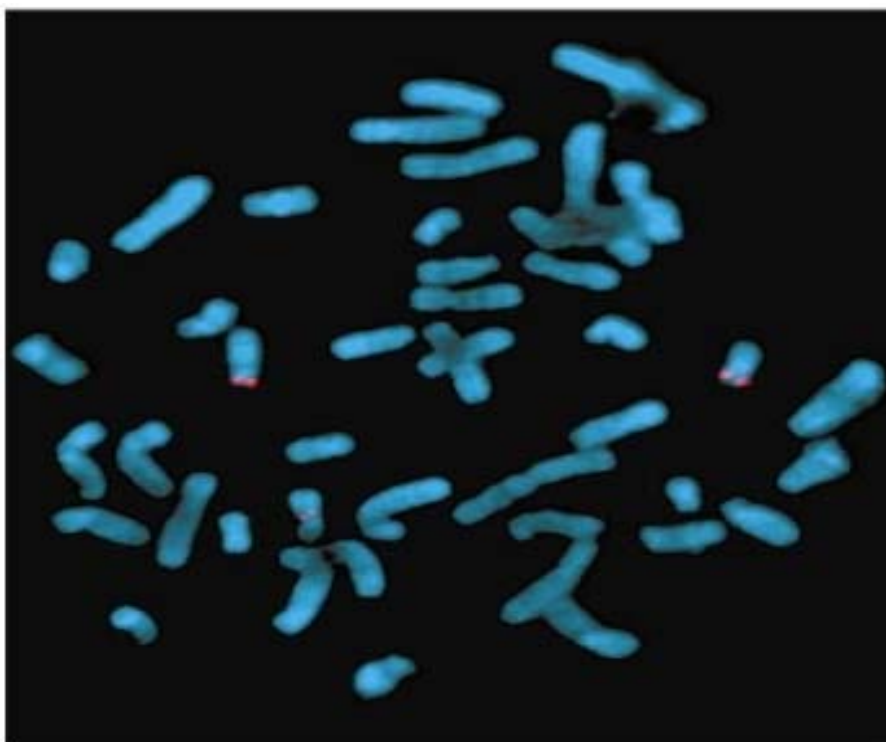


Εικόνα 2: Ανάλυση FISH

Ιστορικά, η τεχνική FISH και γενικά ο *in situ* υβριδισμός έπαιξε πρωτεύοντα ρόλο στη χαρτογράφηση γονιδίων για τα ανθρώπινα χρωμοσώματα. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα αυτά συλλέχθηκαν και συγκεντρώνονται σε βάσεις δεδομένων και οι πληροφορίες αυτές αποδείχθηκαν εξαιρετικά χρήσιμες κατά τη φάση του σχολιασμού του Σχεδίου του Ανθρώπινου Γονιδιώματος (Human Genome Project, HGP). Τώρα που το HGP έχει ολοκληρωθεί, οι ερευνητές χρησιμοποιούν σπάνια τον *in situ* υβριδισμό απλώς για τον προσδιορισμό της χρωμοσωμική θέση ενός ανθρώπινου γονιδίου. Αυτή τη στιγμή, οι FISH εφαρμογές κατευθύνονται κυρίως προς το πεδίο των κλινικών διαγνώσεων (O'Connor, 2008).

## 2.2.2 Διάγνωση χρωμοσωμικών ανωμαλιών με καρυότυπο και FISH

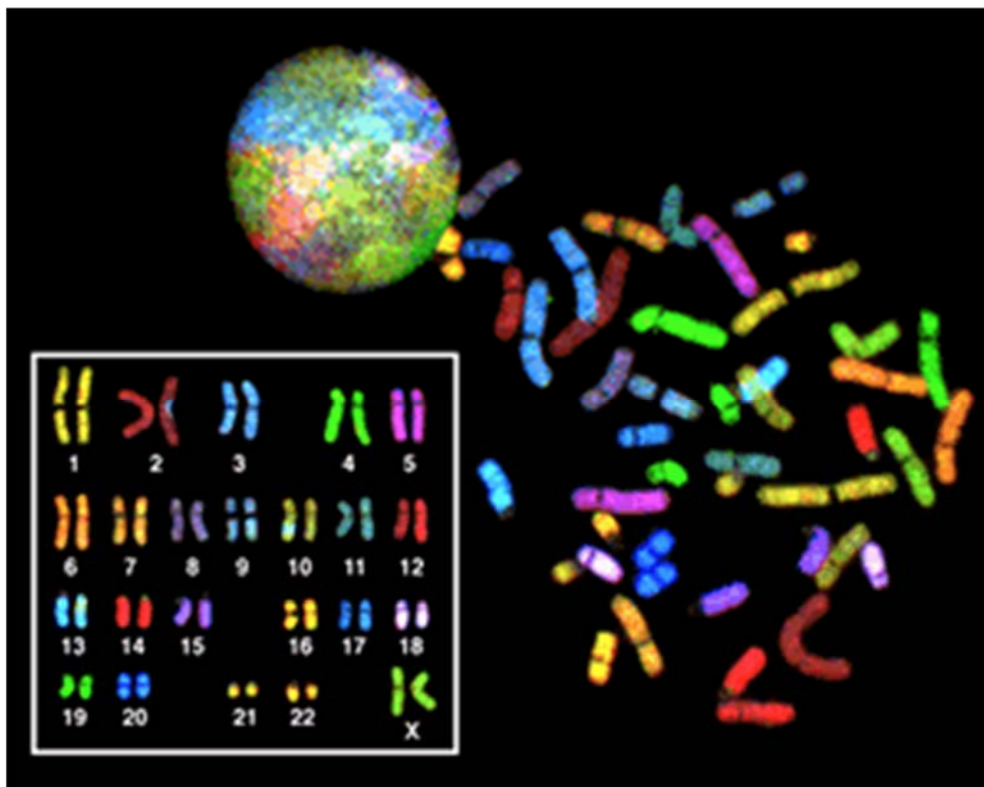
Η τεχνική FISH και οι διαδικασίες του *in situ* υβριδισμού είναι σημαντικές για την κλινική διάγνωση διαφόρων χρωμοσωμικών ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένων των ελλείψεων, των αναδιπλασιασμών και των μετατοπίσεων. Στην εικόνα 3, τρεις περιοχές υβριδοποίησης είναι εμφανείς στην εικόνα φθορισμού. Ένα σημείο αντιστοιχεί στο κανονικό αντίγραφο του χρωμοσώματος 19 του ασθενούς (nl19), και τα άλλα δύο σημεία αντιστοιχούν στην αλλαγμένη, ή προερχόμενη (*der*), εκδοχή των χρωμοσωμάτων 11 και 19 που παρήχθησαν κατά τη διάρκεια της μετατόπισης. Έτσι, οι ερευνητές είναι σε θέση να χρησιμοποιήσουν τα δεδομένα τόσο για να περιορίσουν την περιοχή τομής του χρωμοσώματος 19 όσο και για να ταυτοποιήσουν το άλλο εμπλεκόμενο χρωμόσωμα. Σήμερα, οι κυτταρογενετιστές είναι σε θέση να χρησιμοποιούν εκτεταμένες πηγές από το HGP για να προσδιορίζουν με ακρίβεια τις τοποθεσίες των χρωμοσωμικών ανακατατάξεων που εμφανίζονται στον απλό καρυότυπο.



Εικόνα 3: Παράδειγμα απεικόνισης μετατόπισης (11;19) με FISH

### 2.2.3 Χρήση FISH ανιχνευτών για χρώση όλου του χρωμοσώματος

Η ανίχνευση των χρωμοσωμικών ανακατατάξεων με ειδικούς ανιχνευτές μπορεί να είναι μια μακρά προσπάθεια, ειδικά αν υπάρχουν περίπλοκες αναδιατάξεις ή αν οι αναδιατάξεις αυτές είναι δύσκολο να τυποποιηθούν μορφολογικά. Ευτυχώς, οι κυτταρογενετιστές έχουν πλέον τη δυνατότητα της χρησιμοποίησης πολλαπλών φθορίζουσών ουσιών στο FISH, ο λεγόμενος φασματικός καρυότυπος (Schröck, et al., 1996). Ο φασματικός καρυότυπος, όπως φαίνεται στην εικόνα 4, παρουσιάζει έναν καρυότυπο όπου κάθε χρωμόσωμα βάφεται με ένα συγκεκριμένο χρώμα. Το κάθε χρώμα αποτελεί μία συλλογή από ανιχνευτές υβριδισμού ειδικούς για ακολουθίες που γεφυρώνουν κατά μήκος το κάθε χρωμόσωμα.



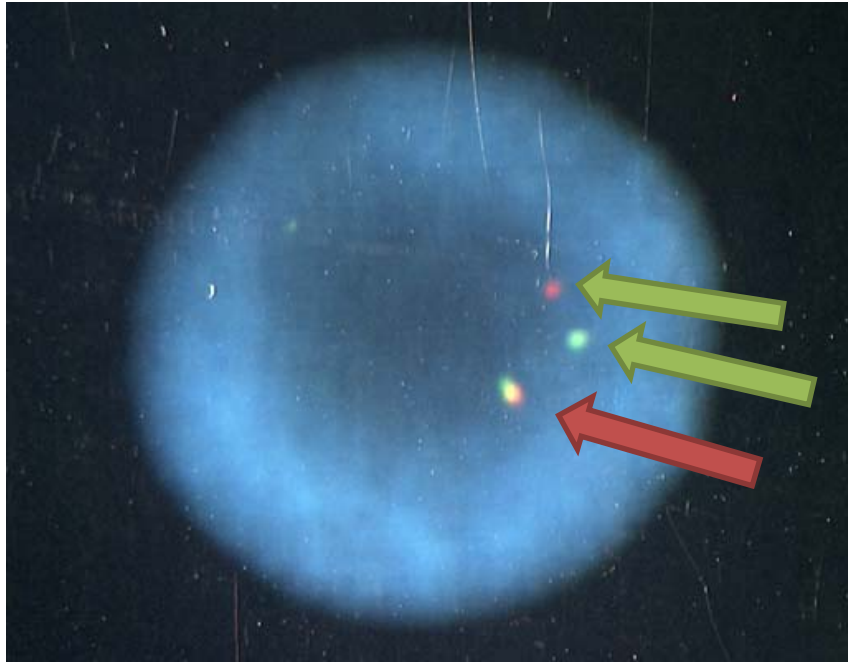
Εικόνα 4: Παράδειγμα φασματικού καρυότυπου

Μολονότι τα χρώματα των χρωμοσωμάτων επιτρέπουν ταχεία εκτίμηση των μεγάλων χρωμοσωμικών αλλαγών κατά τη μετάφραση, η ευκρίνεια της μεθόδου

παραμένει περιορισμένη. Έτσι, ενώ οι χρώσεις επιτρέπουν στους ερευνητές να εντοπίσουν γρήγορα τα χρωμοσώματα που εμπλέκονται σε μετατοπίσεις και τον εντοπισμό μεγάλων ελλείψεων ή αναδιπλώσεων, μικρά ελλείματα και αναδιπλασιασμοί δεν είναι ευδιάκριτοι. Αν οι ερευνητές χρειάζονται πιο λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τις πραγματικές ακολουθίες που εμπλέκονται σε χρωμοσωμικές ανακατατάξεις, πρέπει να χρησιμοποιήσουν ειδικούς ανιχνευτές, όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

#### 2.2.4 Χρήση FISH για την ανάλυση χρωμοσωμάτων σε μεσόφαση

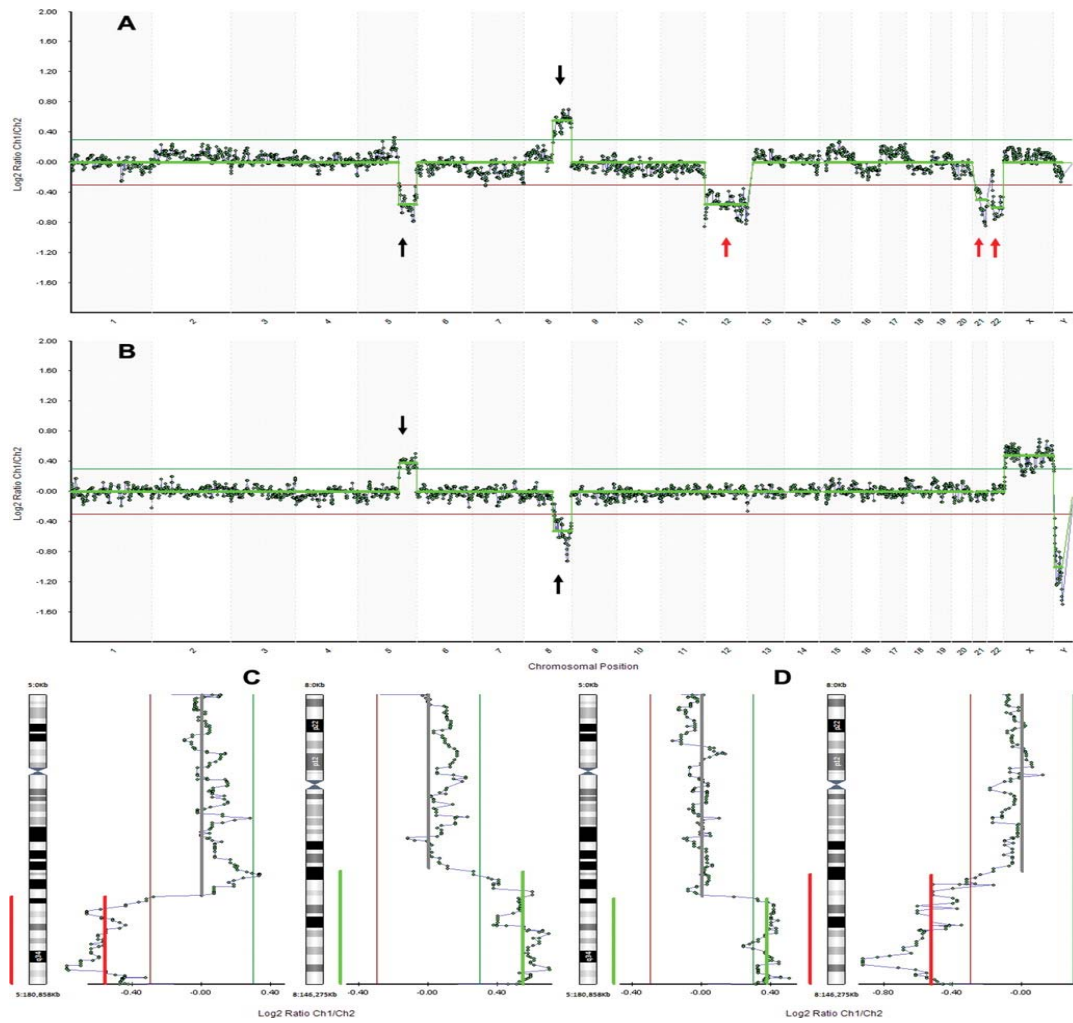
Από την εισαγωγή του FISH, οι κυτταρογενετιστές μπόρεσαν να αναλύσουν χρωμοσώματα τόσο στη μεσόφαση όσο και στη μετάφαση (Trask, 2002). Αυτό προσφέρει ένα πραγματικό πρακτικό πλεονέκτημα, δεδομένου ότι τα κύτταρα δεν χρειάζεται να καλλιεργούνται για αρκετές ημέρες ή εβδομάδες πριν προετοιμαστούν για ανάλυση. Επιπλέον, FISH μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των χρωμοσωμάτων από δείγματα ιστών όπως συμπαγείς όγκους, που παρουσιάζουν ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον αλλά δεν πολλαπλασιάζονται εύκολα. Ένα άλλο χρήσιμο χαρακτηριστικό του FISH είναι ότι οι ερευνητές είναι σε θέση να παρακολουθούν ταυτόχρονα πολλές γονιδιακές θέσεις, αν οι ανιχνευτές σημαίνονται με διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες. Στην εικόνα 5 φαίνεται μία ανάλυση FISH ενός ασθενούς με χρόνια μυελογενής λευχαιμία. Οι ασθενείς χαρακτηρίζονται από μετατόπιση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 9 και 22. Με πράσινα τόξα φαίνονται τα φυσιολογικά χρωμοσώματα 9 και 22, ενώ με το κόκκινο βέλος φαίνεται το παράγων χρωμόσωμα της ένωσης τους.



Εικόνα 5: Ανάλυση FISH σε μεσόφαση

### 2.2.5 Πρόσθετες εφαρμογές FISH στην κλινική και εργαστηριακή έρευνα

Συναρπαστικές νέες εφαρμογές FISH που επεκτείνουν το φάσμα χρήσης του θα συνεχίσουν να αναπτύσσονται (Volpi & Bridger, 2008). Για παράδειγμα, κυτταρογενετιστές τώρα χρησιμοποιούν συγκριτικό γονιδιωματικό υβριδισμό (εικόνα 6) για την ανίχνευση ποσοτικών διαφορών, όπως αριθμητικές παραλλαγές, στα χρωμοσώματα των ασθενών τους. Στη συγκεκριμένη εικόνα παρατηρούμε πως με τον ποσοτικό προσδιορισμό του γονιδιώματος μπορούμε να βρούμε ελλείψεις ή προσθέσεις που δε φαίνονται με γυμνό μάτι. Συγκεκριμένα στο τμήμα A βλέπουμε ολόκληρο το γονιδίωμα ενός ανθρώπου και παρατηρούμε έλλειψη στο χρωμόσωμα 5 και περίσσεια στο χρωμόσωμα 8 (μαύρα τόξα) και ελλείψεις στα χρωμοσώματα 12, 21 και 22 (κόκκινα τόξα). Στο τμήμα B βλέπουμε έναν άρρεν ασθενή με περίσσεια χρωμοσώματος 5 και έλλειψη χρωμοσώματος 8 (μαύρα τόξα). Στα τμήματα C και D φαίνονται χρωμοσώματα που με γυμνό μάτι φαίνονται ίδια αλλά με συγκριτικό υβριδισμό φαίνονται οι αντίστοιχες/αντίθετες ελλείψεις και περίσσειες γονιδιακού υλικού.



Εικόνα 6: Παράδειγμα συγκριτικού υβριδισμού γονιδιώματος

Οι ερευνητές επίσης έχουν τη δυνατότητα να αυξήσουν την ευκρίνεια της ανάλυσης FISH χρησιμοποιώντας ινίδια χρωματίνης ή μικροστοιχίες σαν στόχους. Με εργαλεία όπως αυτά, οι κυτταρογενετιστές περνούν από τη μακροσκοπική μελέτη του χρωμοσώματος στη μικροσκοπική μελέτη του γονιδιώματος από το οποίο αποτελείται.

# Κεφάλαιο 3

## Ανάλυση εικόνας FISH

---

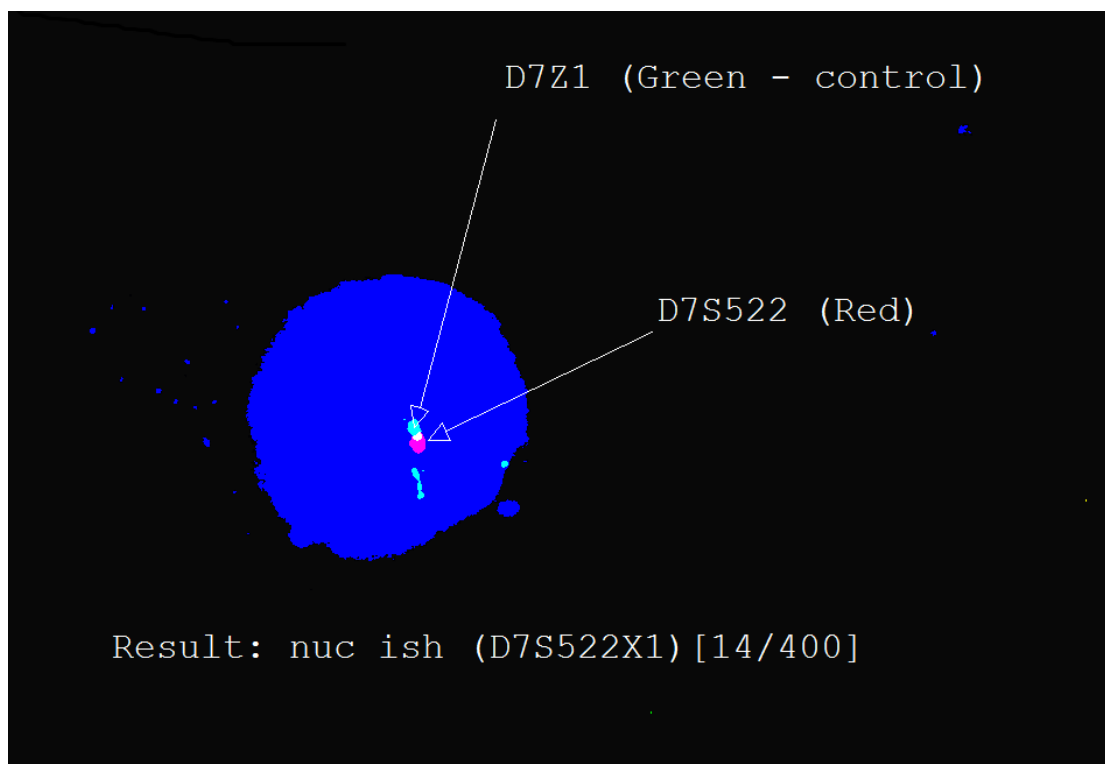
Στο παρόν κεφάλαιο θα παρουσιαστούν μέθοδοι μη-αυτόματης και αυτόματης αξιολόγησης εικόνων FISH, εστιάζοντας στις επιμέρους τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν και δίνοντας έμφαση στο αντίκτυπο που έχουν στην Ιατρική πρακτική παραθέτοντας παραδείγματα που διαφωτίζουν την αναγκαιότητα τους σε καθημερινή βάση.

### 3.1 Μη αυτόματη αξιολόγηση

Στη ρουτίνα της διαγνωστικής διαδικασίας, τα δείγματα προς FISH ανάλυση συνήθως αναλύονται χειρωνακτικά σε 2D μικροσκόπιο. Σύμφωνα με τις συστάσεις του Ευρωπαϊκού Συνδέσμου Κυτταρογενετιστών (ECA), και της εναρμονισμένης σύστασης της τροπολογίας βελτίωσης κλινικού εργαστηρίου, του Αμερικάνικου Κολλεγίου της ιατρικής Γενετικής (ACMG), και του Αμερικάνικου Κολλεγίου Παθολόγων, τα δείγματα πρέπει να αξιολογούνται ανεξάρτητα από δύο εκπαιδευμένους ερευνητές. Αν τα δύο αποτελέσματα διαφέρουν σημαντικά, στη συνέχεια, τρίτο πρόσωπο πρέπει να κληθεί για να παρέχει μια λύση (Hastings, et al., 2007), (Wolff, et al., 2007).

Η σύσταση του ECA σχετικά με τον ελάχιστο αριθμό των κυττάρων που θα πρέπει να αναλυθούν ποικίλλει ανάλογα με το πεδίο εφαρμογής. Για παράδειγμα, για την προγεννητική διάγνωση της ανευπλοειδίας το ECA συνιστά τουλάχιστον 30 κύτταρα, ενώ, για την ανίχνευση του μωσαϊκισμού, ένας ελάχιστος αριθμός 100 κυττάρων θα πρέπει να αναλυθεί. Σύμφωνα με ευρωπαϊκές οδηγίες, ο τυπικός αριθμός κυττάρων για αιματολογικές ή ογκολογικές FISH μελέτες είναι το ελάχιστον 100 (Hastings, et al., 2007), (Ross, et al., 2012). Η σύσταση του ACMG για ανάλυση τόσο των επίκτητων όσο και των συγγενών ανωμαλιών είναι η μελέτη τουλάχιστον 50 πυρήνων, ενώ σε

περίπτωση μωσαϊκισμού ή την παρουσία οποιουδήποτε ανώμαλου κλώνου, ο ελάχιστος αριθμός κυττάρων που θα πρέπει να μελετηθεί υπολογίζεται βάση διωνυμικής κατανομής (Genetics, 2012). Για παράδειγμα, περισσότερα από 400 κύτταρα πρέπει να αναλυθούν για να ανιχνευθεί ένας μικρός κλώνος του 10%, με βεβαιότητα 99% αν η ευαισθησία ανάλυσης είναι 95% (Dewald, et al., 1998).



Εικόνα 7: Παράδειγμα αποτελέσματος FISH από το κυτταρογενετικό εργαστήριο του ΓΝ «Αρχιεπισκόπου Μακαρίου ΙΙΙ»

Στην εικόνα 7 παρατηρούμε ένα αποτέλεσμα από το κυτταρογενετικό εργαστήριο του Γενικού Νοσοκομείου «Αρχιεπισκόπου Μακαρίου ΙΙΙ». Οι κυτταρογενετιστές χρησιμοποιούν δύο ανιχνευτές για τη σήμανση του χρωμοσώματος 7. Ο ανιχνευτής D7Z1 (πράσινο χρώμα) σημαίνει περιοχή κοντά στο κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος 7, ενώ ο ανιχνευτής D7S522 (κόκκινο χρώμα) σημαίνει περιοχή στο μακρό σκέλος. Το αποτέλεσμα, δύο πράσινα σημεία και ένα κόκκινο, μας δηλώνει ότι το δείγμα έχει έλλειψη στο μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 7 (deletion 7q). Το αξιοσημείωτο αυτού του

αποτελέσματος είναι ότι ο κυτταρογενετιστής μελέτησε 400 κυτταρικές μεταφάσεις για να βρει 14 θετικές στη μετάλλαξη κύτταρα, αφιερώνοντας ίσως πάνω από μία μέρα για ένα δείγμα, δίνοντας στον κλινικό ιατρό ένα ακριβές αποτέλεσμα με ποσοστό θετικότητας στη μετάλλαξη στο 3.5%.

Για την ανίχνευση ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου, κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων ή μικροχιμαιρισμού, ο αριθμός των πυρήνων που αναλύονται πρέπει να αυξηθεί ακόμη περισσότερο για την επίτευξη επαρκούς στατιστικής αξιοπιστίας (Carothers, 1994), πράγμα που, κατά συνέπεια, οδηγεί σε μια παρατεταμένη χρονική διάρκεια της ανάλυσης.

Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι FISH ανιχνευτές οδηγούν αναπόφευκτα σε ψευδή θετικότητα (FP) που μπορεί να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό το όριο ανίχνευσης. Διάφορα σετ ανιχνευτών έχουν διαφορετικές τιμές FP που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά τον καθορισμό του οριακού επιπέδου για κάθε FISH εφαρμογή. Αξιοσημείωτο είναι ότι όσο πιο πολύπλοκο είναι το παραγόμενο σήμα, τόσο χαμηλότερη η FP, και τόσο υψηλότερη θα είναι η ψευδής αρνητικότητα. Εκτός από την παρατεταμένη διάρκεια που προκαλείται από το αυξημένο μέγεθος του δείγματος, συνθήκες που κάνουν την μη-αυτόματη FISH ανάλυση δύσκολη είναι οι ακόλουθες:

- (i) σε ακραίες περιπτώσεις θετικότητας του παραγόμενου σήματος η μεροληψία του ερευνητή μπορεί να οδηγήσει σε υπό- ή υπερεκτίμηση του ποσοστού της θετικότητας (van de Rijke, et al., 1996),
- (ii) η διεπιστημονική και διεργαστηριακή μεταβλητότητα θέτει υπό συζήτηση τη σύγκριση των αποτελεσμάτων (Moore, et al., 1996),
- (iii) η αντικειμενική αξιολόγηση των μετατοπίσεων γίνεται δυσκολότερη λόγω της έλλειψης ενός ευρέως αποδεκτού πρωτοκόλλου για τον ορισμό του σήματος σύντηξης. Μερικά εργαστήρια υπολογίζουν σαν θετικά σήματα μόνο εκείνους τους πυρήνες που περιέχουν σαφώς ορατή σύντηξη σημάτων (Chase, et al., 1997), ενώ άλλοι συνυπολογίζουν τα σχετικά σήματα (Amare, et al., 2001), και ακόμα άλλοι συνυπολογίζουν όλα τα σήματα που η μεταξύ τους απόσταση

είναι κάτι περισσότερο από τη μέση διάμετρο των σημάτων που εμπλέκονται (Kowalczyk, et al., 2003).

Εν συντομία, η μη-αυτόματη αξιολόγηση σημάτων FISH ανάλυσης είναι μια χρονοβόρα, επίπονη, και επισφαλής διαδικασία που απαιτεί τουλάχιστον δύο εκπαιδευμένους ερευνητές. Η διεπιστημονική μεταβλητότητα μπορεί να οδηγήσει σε παρερμηνείες και ασυνέπειες βαθμολόγησης, ενώ η διεργαστηριακή μεταβλητότητα δυσχεραίνει τη σύγκριση των αποτελεσμάτων.

## 3.2 Αυτόματη αξιολόγηση

Η επιστημονική κοινότητα λαμβάνοντας υπόψη όλα τα προαναφερθέντα κάνει προσπάθειες εισαγωγής της τεχνολογικής εξέλιξης στο χώρο της κυτταρογενετικής ανάλυσης αυτοματοποιώντας τη διαδικασία ανάλυσης εικόνας FISH.

### 3.2.1 Απαιτήσεις υλικού και λογισμικού της αυτόματης ανάλυσης δείγματος FISH

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αυτόματη ανάλυση, στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων, εκτελείται χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο φθορισμού ή σαρωτή, ενώ πιο εξελιγμένες τεχνολογίες όπως η μικροσκόπηση με ομοεστιακό λέιζερ σάρωσης ή η κυτταρομετρία με λέιζερ σάρωσης εφαρμόζονται λιγότερο συχνά (Adiga & Chaudhuri, 1999), (Baumgartner, et al., 2001), (Lin, et al., 2003). Αυτό δείχνει ότι η απλότητα του μέσου, ένα χαρακτηριστικό που επηρεάζει την τιμή του, είναι απαραίτητη για τη διάδοση της κάθε μεθόδου ως ένα διαγνωστικό και ερευνητικό εργαλείο. Πολλά συστήματα που προορίζονται για αυτόματη FISH εφαρμογή είναι διαθέσιμα. Ελάχιστες απαιτήσεις ενός πλήρους συστήματος είναι οι εξής:

- αξιόπιστη πηγή φωτός,
- κατάλληλο φίλτρο,

- αντικειμενικοί φακοί,
- ανιχνευτή σήματος,
- μηχανοποιημένο στάδιο σάρωσης,
- έναν υπολογιστή εξοπλισμένο με κατάλληλο λογισμικό.

Αναφορικά με το φωτισμό σε μοντέρνα απεικόνιση με φθορισμό, ισχυρότερη διέγερση μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας λέιζερ. Ωστόσο, αυτή η δύναμη δεν είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό FISH σημάτων. Η παραδοσιακή και πιο κοινή πηγή φωτός των μικροσκοπίων φθορισμού είναι ο υδραργύρου/ξένου τοξωτός λαμπτήρας. Είναι φθηνός αφενός, αλλά παρέχει ανομοιογενή φωτισμό ακόμη και μετά την οπτική βελτιστοποίηση, επομένως απαιτείται ψηφιακή διόρθωση εκ των προτέρων ή εκ των υστέρων. Αν και, υπάρχουν διαθέσιμα στο εμπόριο προϊόντα που προσπαθούν να ξεπεράσουν αυτό το πρόβλημα, η ανομοιογένεια μπορεί να εξαλειφθεί με πολύ πιο αποτελεσματικό τρόπο με τη χρήση φωτεινής πηγής παρέχοντας σχεδόν ομοιογενή φωτισμό. Αν το φως έρχεται από τον υδράργυρο/ξένο λαμπτήρα μέσα από ένα χαλαζία οπτικών ινών οπτικής κρυπτογράφησης, το αποτέλεσμα θα είναι φωτεινότερο και με μειωμένη διακύμανση. Επιπλέον, η διάρκεια ζωής του είναι πέντε με εκατό φορές μεγαλύτερη από τις άλλες συμβατικές πηγές φωτός (Kumar & Zucker, 2008). Τέλος, προηγμένη χρήση ηλεκτρονικού φωτός (LED) ήταν επίσης διαθέσιμη στο πρόσφατο παρελθόν. Αξιοσημείωτα πλεονεκτήματά του είναι η χαμηλή κατανάλωση τάσης και ενέργειας, η μεγάλη διάρκεια ζωής και την υψηλή ταχύτητα, που μπορεί να μειώσει σημαντικά το χρόνο της λήψης εικόνας (Varga, et al., 2009), (Wessels, et al., 2012).

Η επιλογή των αντικειμενικών φακών γίνεται από το εκάστοτε εργαστήριο λαμβάνοντας υπόψη τη μεγέθυνση και την ταχύτητα της ανάλυσης. Για την ανίχνευση FISH σημείων είναι απαραίτητος ένας αντικειμενικός φακός εύρους x320 (Canela, et al., 2007), (Johnson, et al., 2007). Ωστόσο, από τη στιγμή που εκτός του αριθμού και της έντασης των σημάτων εξίσου σημαντικό είναι και η διαμόρφωση του σήματος στο χώρο, η εφαρμογή μιας υψηλότερης μεγέθυνσης και υψηλής ευκρίνειας είναι επιθυμητή (Alprár, et al., 2008). Πάνω σε αυτό το μήκος κύματος πολλές ομάδες εργασίας χρησιμοποίησαν αντικειμενικούς φακούς x360, x363 και x3100 για αυτόματη FISH ανάλυση (Blandin, et al.,

2008), (Carrell & Emery, 2008), (Katz, et al., 2008), (Konsti, et al., 2008). Μια εναλλακτική προσέγγιση, επίσης, αύξησης της ταχύτητας, είναι η χρήση δύο αντικειμενικών φακών, έναν για την επιλογή του πυρήνα και έναν για την ανίχνευση FISH σημάτων (Evans, et al., 2006), (Knudson RA, 2007), (Seppo, et al., 2008), (Wauters, et al., 2007). Η ευκρίνεια, πέραν του επηρεασμού από το μήκος κύματος του φωτός, θα μπορούσε να αυξηθεί αυξάνοντας το αριθμητικό διάφραγμα (NA), ωστόσο, αυτό ταυτόχρονα μειώνει το βάθος πεδίου (DOF). Αυτό είναι ένα σημαντικό δούναι και λαβείν, όταν πρόκειται για την αυτοματοποίηση, γιατί για μία αληθινή τριών διαστάσεων ανάλυση γίνεται απαραίτητο ένα ορισμένο DOF.

Κατάλληλη επιλογή του φίλτρου είναι ένα άλλο σημαντικό σημείο. Η διέγερση φίλτρων με πολύ ευρύ φάσμα θα παράγουν υψηλή ένταση εις βάρος της διέγερσης των μη-ειδικών φθορίζουσών ουσιών. Επιπλέον, πάρα πολλά φωτόνια ξεθωριάζουν το δείγμα. Φίλτρα στενού φάσματος διεγείρουν μόνο συγκεκριμένες φθορίζουσες ουσίες, ωστόσο, όταν το φάσμα είναι πολύ στενό, οι εκπομπές θα μπορούσαν να πέσουν προς τα κάτω σε τέτοιο επίπεδο όπου η αναλογία σήμα προς θόρυβο να γίνει μη ιδανική. Για να αποφευχθεί περισσότερο το προαναφερθέν ξεθώριασμα της εικόνας συνιστάται η έναρξη σάρωσης συγχρόνως με τη διέγερση του φίλτρου στο υψηλότερο μήκος κύματος και συνεχίζοντας προς το μικρότερο μήκος κύματος. Η επιλογή του καταλληλότερου φίλτρου δεν επηρεάζεται μόνο από το φάσμα διέγερσης και εκπομπής των φθορίζουσών ουσιών, αλλά επίσης και από τον τύπο του ανιχνευτή. Οι έγχρωμες κάμερες επιτρέπουν την ανίχνευση των διαφόρων ουσιών και χρωμάτων την ίδια στιγμή, εξοικονομώντας το χρόνο που απαιτείται για την αλλαγή του φίλτρου (Tanke, et al., 1995a), (Tanke, et al., 1995b). Ωστόσο, το πλεονέκτημα αυτό περιορίζεται επειδή τα εμπορικά διαθέσιμα φίλτρα είναι μόνο σε θέση να διακρίνουν μέχρι και τρία ή τέσσερα χρώματα συμπεριλαμβανομένου της αντιχρωστικής. Εάν πρέπει να ερευνηθούν περισσότεροι από 2 ή 3 στόχοι, η χρήση ασπρόμαυρων καμερών ή φωτοπολλαπλασιαστικού σωλήνα, φίλτρων μονής διόδου, και μοτέρ περιστροφικού τροχού είναι αναπόφευκτη (Tanke, et al., 1995a). Η αλλαγή φίλτρου προϋποθέτει σφάλμα στη μετατόπιση του εικονοστοιχείου που

προκαλείται κυρίως από την απόκλιση δέσμης φωτός που δημιουργείται από μια μη μηδενική σφηνοειδή γωνία διχρωϊκού διαχωριστή δέσμης και/ή από το φίλτρο εκπομπής και οδηγεί σε ατελή επικάλυψη των εικόνων των διαφορετικών χρωμάτων. Αυτό το ανεπιθύμητο φαινόμενο είναι ιδιαίτερα ανησυχητικό αν ανιχνευτές μετατόπισης ή αντιστροφής εφαρμόζονται όπου ο χρωματισμός του σημείου είναι ιδιαίτερης σημαντικότητας. Αυτό το σφάλμα μετατόπισης, ωστόσο, είναι διορθώσιμο χρησιμοποιώντας ένα φίλτρο μηδενικού εικονοστοιχείου μετατόπισης και/ή εξελιγμένους αλγορίθμους. Επιπλέον, η μονοχρωματική κάμερα έχει ένα τεράστιο πλεονέκτημα σε σύγκριση με την έγχρωμη επειδή η συνεχόμενη καταγραφή των διαφόρων χρωμάτων επιτρέπει τη χρήση διαφορετικών χρόνων ολοκλήρωσης συγκεκριμένων για μεμονωμένες φθορίζουσες ουσίες (Tanke, et al., 1995b), (Tanke, et al., 1995a).

Χρειάζεται ένας αυτόματος μηχανισμός με δυνατότητες κίνησης με ακρίβεια μικρομέτρου για να επιτευχθεί η σύλληψη των εικόνων και η επανατοποθέτηση των αντικειμένων βάση των ήδη αποθηκευμένων συντεταγμένων. Το κεντρικό λογισμικό ελέγχει και εναρμονίζει τις κινήσεις ανά στάδιο, την αλλαγή φίλτρου και τον χρόνο έκθεσης. Επιπλέον, αποθηκεύει ψηφιακά επεξεργασμένες εικόνες σχετικά με αντικείμενα και/ή ολόκληρες ψηφιακές διαφάνειες. Λόγω της σχετικής δυνατότητας συλλογής σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου, τα αντικείμενα μπορεί να επιλεχτούν αργότερα, βάση προαιρετικών χαρακτηριστικών ακόμη και με μέθοδο πολλαπλών σταδίων. Ωστόσο, μόνο βασικά χαρακτηριστικά και παράμετροι αξίζει να αποθηκευτούν διότι μεγάλες βάσεις δεδομένων επιβαρύνουν άσκοπα την αποθηκευτική ικανότητα των υπολογιστών.

### 3.2.2 Διαδικασία εκπαίδευσης

Η διαδραστική βελτιστοποίηση των επιδόσεων ενός αυτοματοποιημένου συστήματος συνήθως προηγείται της εφαρμογής του. Αυτή η διαδικασία συχνά αποκαλείται εκπαίδευση ή κατάρτιση. Αποφεύγοντας τη λεπτομερή ανάλυση απλά πρέπει να αναφερθεί ότι, διαφορετικά συστήματα εφαρμόζουν ελαφρώς

ανόμοιες προσεγγίσεις και το επίπεδο της διαδραστικότητας που προσφέρεται από διάφορα συστήματα θα μπορούσε να είναι σημαντικά διαφορετικό. Όλες οι οδηγίες σε γενικές γραμμές συμβουλεύουν τα εξής: οι πρώτες εικόνες που συλλαμβάνονται από τα δείγματα είναι μέτριας ποιότητας, οπότε και συνιστάται επεξεργασία για τη βελτιστοποίηση της εικόνας καθώς και διαδικασίες ψηφιακής συγκάλυψης, στη συνέχεια, ο ερευνητής κατατάσσει με μη αυτόματο τρόπο όλα τα αντικείμενα και τις μορφομετρικές παραμέτρους που επαρκούν για τον πυρήνα ή ανιχνεύουν σήματα βάσει επαναλαμβανόμενων προσαρμογών και δοκιμών. Η διαδικασία βελτιστοποίησης συνεχίζεται μέχρι να φτάσει στο υψηλότερο δυνατό επίπεδο επιδόσεων (Pajor, et al., 2012a).

### 3.2.3 Ακολουθία της ανάλυσης

Τα κύρια βήματα της αυτόματης ανάλυσης είναι πανομοιότυπα με αυτά της μη-αυτόματης αξιολόγησης:

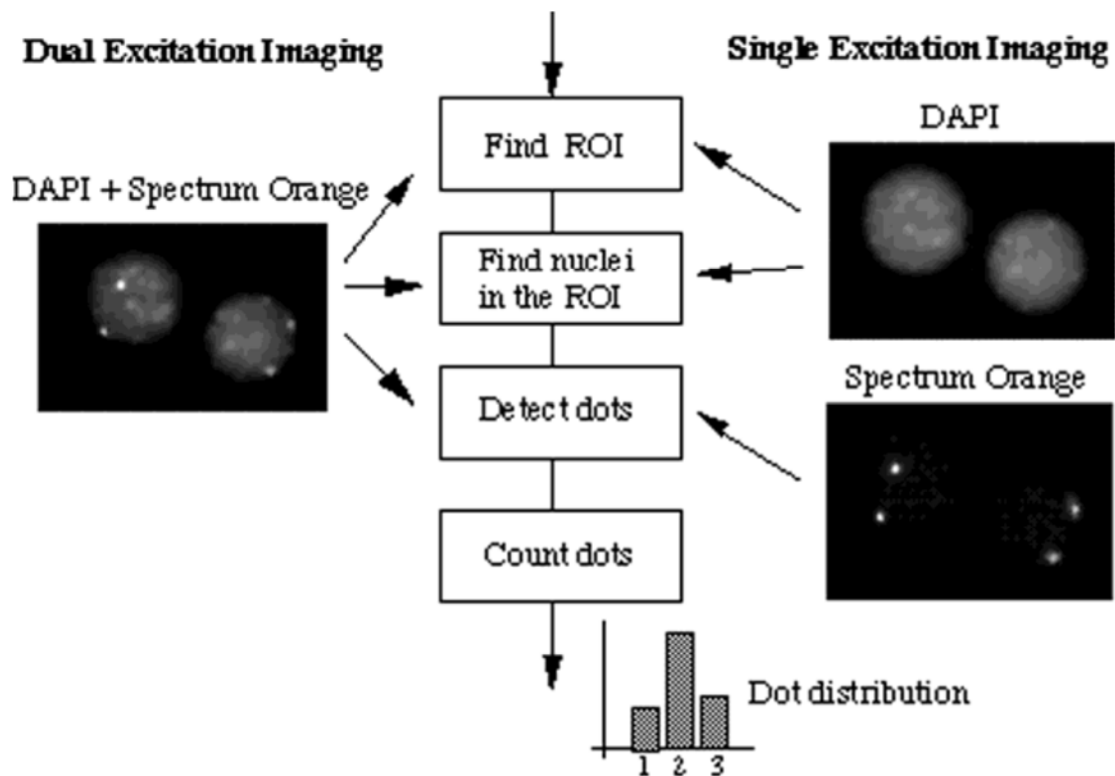
- (i) επιλογή του πυρήνα,
- (ii) ανίχνευση σήματος, και
- (iii) αξιολόγηση του σήματος.

Η διαδικασία αρχίζει με τον καθορισμό της περιοχής ενδιαφέροντος (region of interest, ROI) που μπορεί να εκτελεστεί με μη αυτόματο τρόπο ή χρησιμοποιώντας προκαθορισμένες περιοχές στη διαφάνεια. Λαμβάνοντας υπόψη την ενδεχόμενη ανομοιογενή κατανομή των στόχων, μερικές φορές, είναι πρακτικό να προσδιοριστούν πολλές μικρότερες ασυνεχείς περιοχές αντί για μία μεγάλη περιοχή. Επισήμανση ενός εύκολα αναγνωρίσιμου σημείου αναφοράς διευκολύνει αργότερα την επανατοποθέτηση των αντικειμένων. Κατά την αυτόματη εστίαση, το σύστημα χαρτογραφεί τις Z συντεταγμένες της διαφάνειας σε κάθε σημείο τομής του εικονικού πλέγματος. Αφού εφαρμοστεί η θέση της καλύτερης εστίασης για όλα τα αυτο-εστιακά σημεία, θα παρεμβάλλεται στο κέντρο κάθε οπτικού πεδίου (field of view, FOV) της ROI. Για να εξασφαλισθεί ότι το καλύτερο πλάνο εστίασης θα επιλεγεί για κάθε FOV,

δικαιολογείται επιλεκτική εστίαση προτού κάθε έκθεσης (Kajtár, et al., 2006). Μετά την απόκτηση των πρώτων εικόνων σε αντιχρωστικά και σημειακά κανάλια, η ποιότητα των εικόνων αξίζει τη βελτίωση μέσα από διάφορα βήματα επεξεργασίας εικόνας (όπως, διόρθωση φόντου, φίλτρα θορύβου, και ευκρίνεια σήματος).

Οι Fernandez et al. (Fernández, et al., 1996) ασχολήθηκαν με το ιστόγραμμα των εικόνων που έδειξε δύο μη-επικαλυπτόμενες κορυφές, από τις οποίες μία αντιστοιχούσε στην περιοχή έντασης αντιχρωστικής μεταξύ 100 και 150 και άλλη μία αντιστοιχούσε σε ένταση σήματος FISH μεταξύ 175 και 255. Έτσι, χρησιμοποιώντας ένα απλό κατώφλι, η κατάτμηση των FISH σημάτων πραγματοποιούνταν με αναφερόμενες κουκίδες ή κηλίδες. Τα αποτελέσματα της μεθόδου ήταν συγκρίσιμα με ανάλογη ανάλυση με γυμνό μάτι.

Οι Netten et al. (Netten, et al., 1997) ανέπτυξαν μια αυτόματη μέθοδο για καταμέτρηση σημείων ανά πυρήνα κυττάρων στα επιχρίσματα λεμφοκυττάρων από καλλιέργεια αίματος. Το σύστημα περιλαμβάνει όλα τα στοιχεία που είναι κοινά για επεξεργασία και ανάλυση εικόνας: αυτόματη εστίαση, απόκτηση εικόνας, κατάτμηση, μέτρηση και ταξινόμηση. Η απόκτηση της εικόνας ακολουθείται από εξειδικευμένο αλγόριθμο καταμέτρησης των σημείων. Ο αλγόριθμος είναι χωρισμένος σε τέσσερα βήματα: (1) βρίσκει μια περιοχή που περιέχει έναν πυρήνα, (2) βρίσκει τον πυρήνα στην περιοχή, (3) βρίσκει τα σημεία του πυρήνα, και (4) μετρά σημεία και ενημερώνει το ιστόγραμμα για ολόκληρη την αντικειμενοφόρο πλάκα (εικόνα 8). Οι συγγραφείς χρησιμοποιούν φίλτρα για τον καθαρισμό της εικόνας από κηλίδες και σκιές, και αυτόματο κατώφλι για την επιλογή της ROI. Εφαρμογή κατωφλίου ISODATA (Ridler & Calvard, 1978) χρησιμοποιήθηκε για να διαχωριστεί το κύτταρο από το φόντο (Netten, et al., 1997). Για την ανίχνευση σημάτων FISH, οι συγγραφείς τμηματοποίησαν και πάλι τις αρχικές εικόνες στο εσωτερικό της μάσκας του πυρήνα χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικές τεχνικές με βάση το μετασχηματισμό top-hat (Meyer, 1979). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ποιότητα του επιχρίσματος επιδρά στην απόδοση του συστήματος, ενώ ο θόρυβος, ο υψηλός αυτοφθορισμός, και η χαμηλή ένταση του ανιχνευτή μπορούν να κάνουν τα αποτελέσματα αναξιόπιστα.



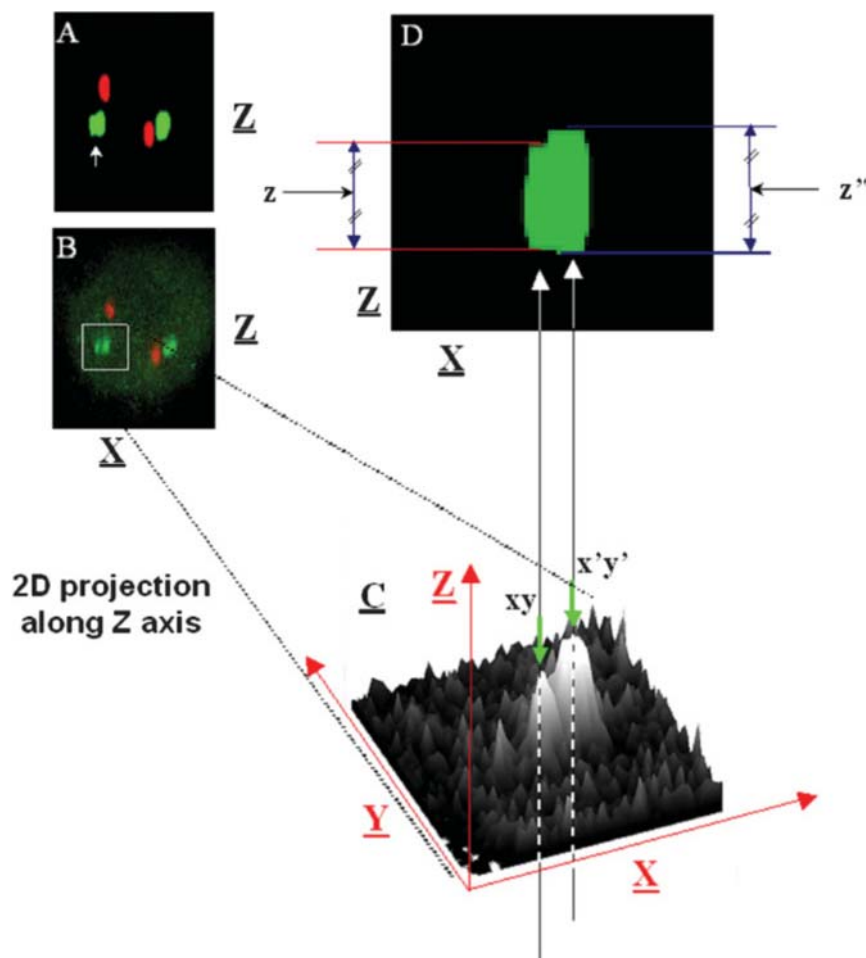
Εικόνα 8: Αλγόριθμος ανάλυσης εικόνας FISH κατά Netten, et al., (Netten, et al., 1997)

Σύστημα για αυτόματη ανίχνευση και βαθμολόγηση των σημάτων FISH σε πυρήνα στη μεσόφαση αναπτύχθηκε από τους Solórzano et al. (Solórzano, et al., 1998). Μετά την εστίαση αποκτώνται τρεις εικόνες: μία αντιχρωστική και δύο εικόνες σημάτων FISH. Οι εικόνες διορθώνονται πριν αναλυθούν. Μετά τη διόρθωση η οποία περιλαμβάνει διόρθωση σκιάς, αφαίρεση φόντου, διόρθωση αυτοφθορισμού, και επανόρθωση χρώματος, οι εικόνες τμηματοποιούνται εξάγοντας τις απαιτούμενες πληροφορίες. Οι πυρήνες τμηματοποιούνται με αλγόριθμους ISODATA στην αντιχρωστική εικόνα. Μετά την εφαρμογή του μετασχηματισμού απόστασης, τα συμπλέγματα των πυρήνων χωρίζονται στα επιμέρους συστατικά τους, χρησιμοποιώντας το μορφολογικό αλγόριθμο watershed (Malpica, et al., 1997). Τα σήματα FISH εξάγονται με μετασχηματισμό top-hat που ακολουθείται από έναν περιοδικό αλγόριθμο ανασυγκρότησης που καταργεί δευτερεύουσες κορυφές και αναδομεί το περίγραμμα των

πραγματικών σημάτων. Από την αξιολόγηση του συστήματος, οι συγγραφείς αναφέρουν ότι τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα με αυτά ειδικών εμπειρογνομώνων.

Οι Kozubek et al. (Kozubek, et al., 1999) ανέπτυξαν ένα πλήρως αυτόματο σύστημα που ανακτά και αναλύει 2D και 3D FISH εικόνες. Το σύστημα παρέχει ηλεκτρονική ανάλυση, αμέσως μετά την ανάκτηση της εικόνας, όπου αποφασίζεται αν θα αποθηκευτεί ή όχι, καθώς και ανάλυση εκτός σύνδεσης, οποία πραγματοποιείται στις αποθηκευμένες εικόνες σε μεταγενέστερο χρόνο. Κατά την ηλεκτρονική ανάλυση, η ποιότητα της πρόσφατα ανακτηθείσας εικόνας ελέγχεται με τον υπολογισμό της έντασης του ιστογράμματος και την εφαρμογή ανάλυσης δι-επίπεδου ιστογράμματος. Για την ανάλυση της 2D εικόνας, το σύστημα πρώτα τμηματοποιεί τους πυρήνες χρησιμοποιώντας κατώφλι, και στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία βελτίωσης της παραγόμενης εικόνας. Στη συνέχεια, το σύστημα εντοπίζει τα υβριδίζοντα σημεία εντός κάθε τμηματοποιημένου πυρήνα βασιζόμενο σε μία watershed-type τεχνική που ονομάζεται «σταδιακή κατωφλίωση». Ο αλγόριθμος εκτελεί κατωφλίωση σταδιακά από το ανώτατο όριο στο χαμηλότερο. Για κάθε βήμα (κατώφλι), πραγματοποιείται κατάτμηση βασισμένη στο επιλεγμένο κατώφλι, και το αποτέλεσμα συγκρίνεται με το αποτέλεσμα της κατάτμησης στο προηγούμενο βήμα. Εάν εμφανίζεται ένα νέο αντικείμενο, θεωρείται να είναι ένα πιθανό υβριδίζον σημείο, εάν όχι τότε τοποθετείται πολύ κοντά σε ένα ήδη υπάρχον σημείο. Στην περίπτωση αυτή, τα δύο γειτονικά τοπικά μέγιστα θεωρούνται ως διακυμάνσεις της έντασης ενός πραγματικού σημείου. Δύο εναλλακτικές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση εικόνας 3D. Στην πρώτη, η 2D ανάλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί στη μέγιστη εικόνα, η οποία ορίζεται ως η εικόνα όπου κάθε εικονοστοιχείο βρίσκεται στη μέγιστη ένταση. Με την άλλη μέθοδο για την ανάλυση των εικόνων 3D, όλα τα επιχρίσματα αναλύονται με 2D ανάλυση και αποθηκεύονται οι πληροφορίες για τους πυρήνες και τα σημεία. Ο αντίστοιχος πυρήνας και σημείο βρίσκονται συγκρίνοντας την εικόνα κάθε διαφάνειας, διασφαλίζοντας ότι η μέγιστη ένταση του κάθε σημείου είναι πάντα στη θέση της εστίασης. Όπως αναφέρουν οι συγγραφείς, περαιτέρω αλλαγές του προτεινόμενου συστήματος να βελτίωναν την αξιολόγηση των 3D εικόνων.

Οι Gué et al. (Gué, et al., 2005) ανέπτυξαν λογισμικό, επονομαζόμενο 3D FISH, για να αυτοματοποιήσει τις μετρήσεις των αποστάσεων και την τμηματοποίηση των σημείων σε εικόνες από 3D FISH πειράματα. Σύμφωνα με την προσέγγιση τους, όλη η επεξεργασία εικόνας γίνεται σε voxels και μία 3D έγχρωμη εικόνα θεωρείται ως μια σειρά από δυνητικά απεριόριστο αριθμό γκρι 3D εικόνων, η καθεμία αντιστοιχεί σε ένα διαφορετικό χρωματικό κανάλι και ανιχνευτή.

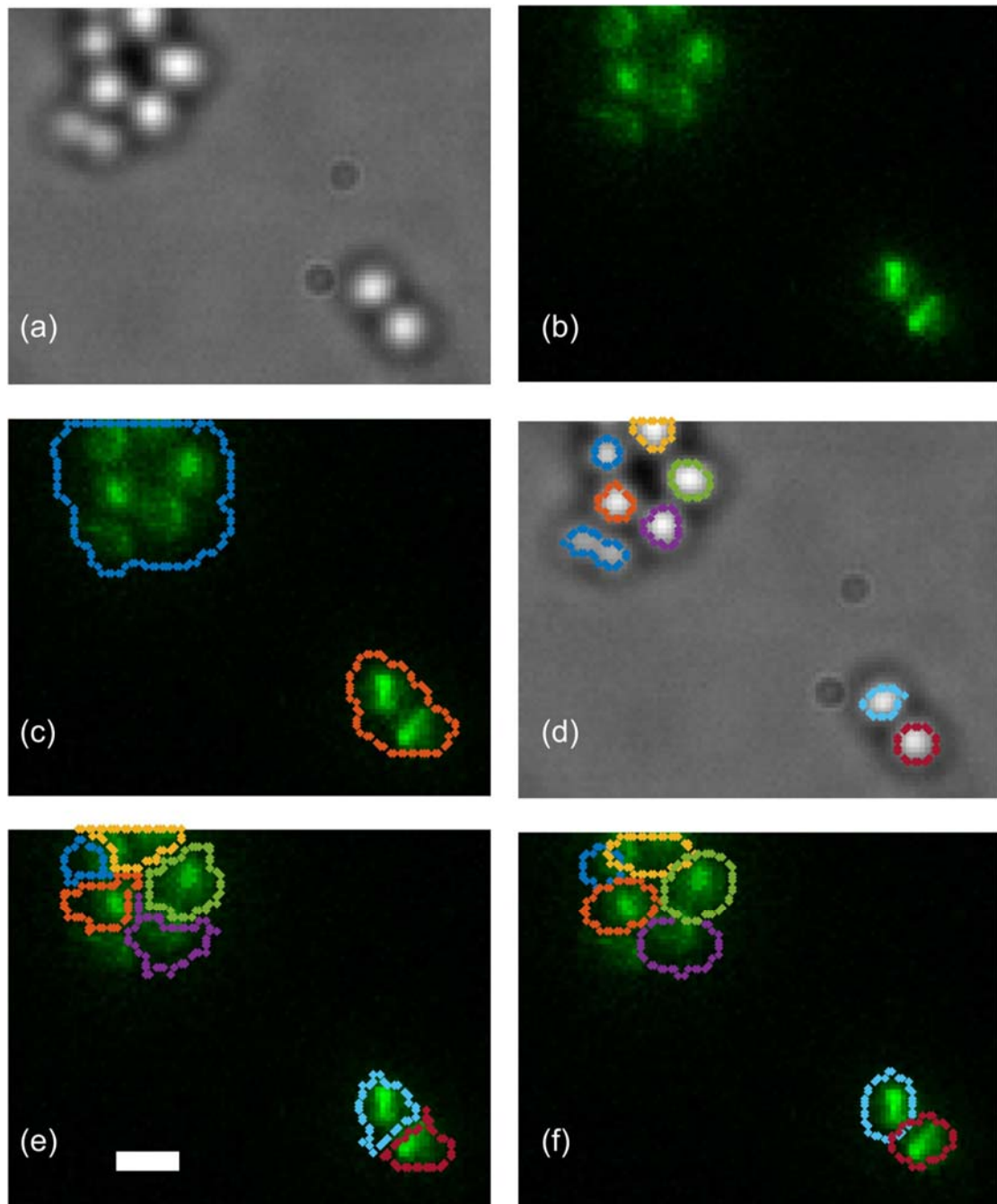


Εικόνα 9: Ανάλυση εικόνας 3D FISH κατά Gué (Gué, et al., 2005)

Στην εικόνα 9 φαίνεται στο τμήμα A η δισδιάστατη εικόνα FISH όπου διαπιστώνεται ότι το σήμα με το άσπρο βέλος υπερβαίνει τις επιλεγμένες οριακές τιμές. Η μεταφορά του τμήματος της εικόνας B που βρίσκεται στο τετράγωνο στην εικόνα D φαίνεται ότι το σήμα αποτελείται από δύο σήματα διαφορετικού ύψους. Στην εικόνα C αποτυπώνεται η τρισδιάστατη μορφή του

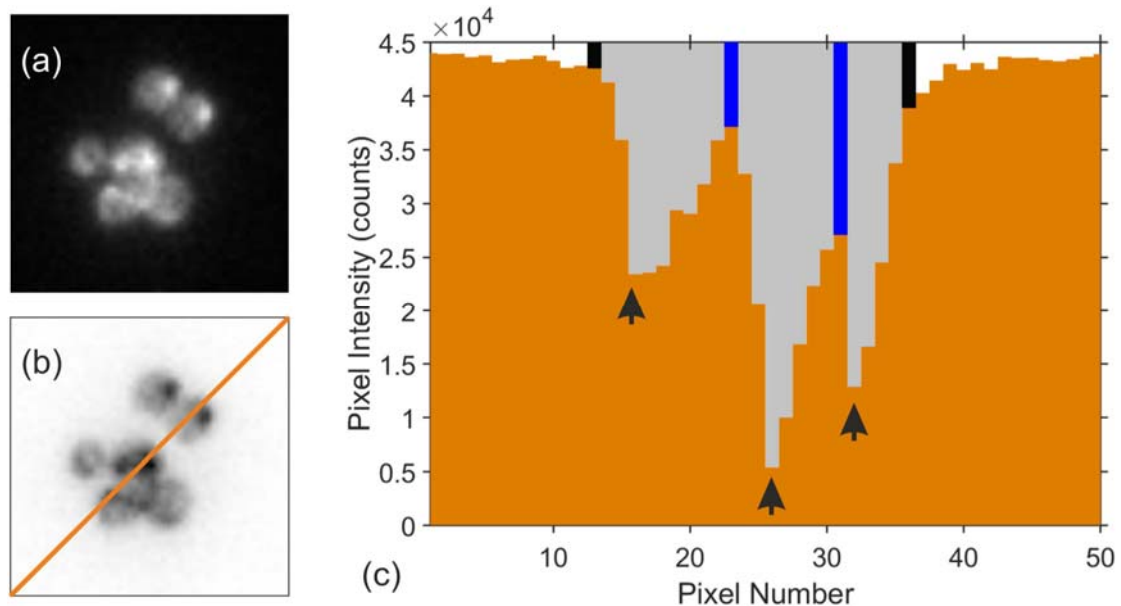
ίδιου σημείου όπου διακρίνεται η διαφορετικότητα στο ύψος των δύο σημάτων διαφορετικού ύψους Z.

Πρόσφατα οι Wollman et al (Wollman, et al., 2016) παρουσίασαν ένα πλαίσιο ανάλυσης εικόνας για αυτόματη ανίχνευση και τμηματοποίηση εικόνας κυττάρων σε κυτταρικές ομάδες χρυσίζοντος σταφυλόκοκκου.



Εικόνα 10: Κατάτμηση κυττάρων σε μικροβιακό πληθυσμό

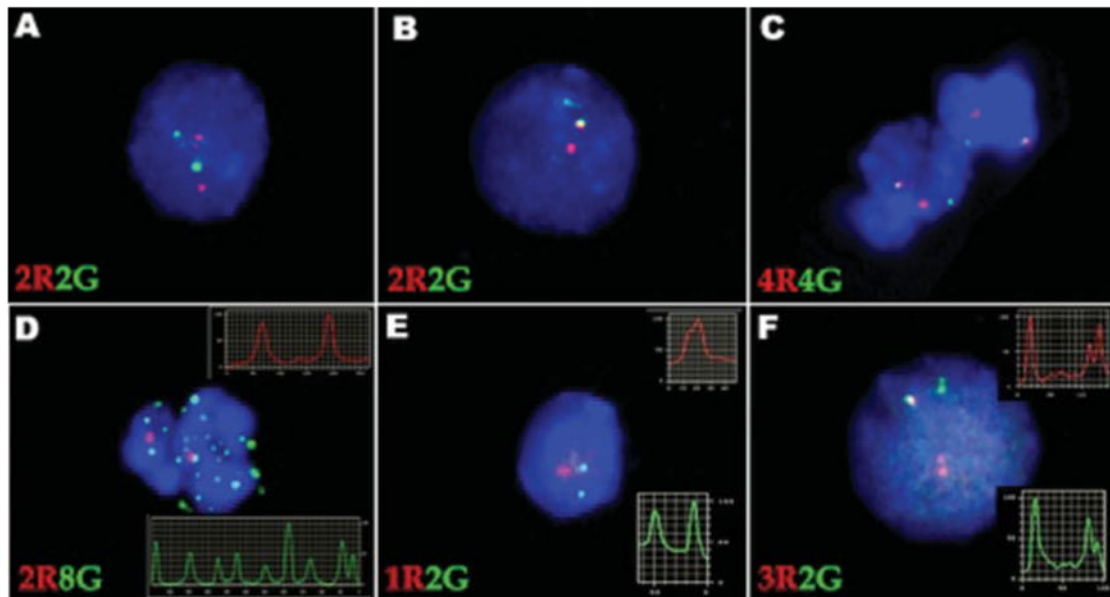
Στην εικόνα 10 παρατηρούμε τη διαδικασία κατάτμησης των κυττάρων σε σταφυλοκοκκικούς πληθυσμούς χρησιμοποιώντας αλγόριθμο στηριζόμενο στην ένταση του χρωματισμού. Στην εικόνα 11 βλέπουμε από την ίδια μελέτη το διαχωρισμό των κυττάρων με αλγόριθμο watershed. Οι μαύρες γραμμές υποδηλώνουν τα όρια του πληθυσμού ενώ οι μπλε χωρίζουν τα κύτταρα μεταξύ τους. Συγκρίνοντας την εικόνα 3(c) με την εικόνα 3(b) παρατηρούμε ότι η κίτρινη γραμμή τέμνει τρία κύτταρα όπως ακριβώς δείχνει και το ιστόγραμμα (βέλη).



Εικόνα 11: Χρήση αλγόριθμου watershed για την κατάτμηση μικροβιακών κυττάρων

Οι Kajtár et al. (Kajtár, et al., 2006) εφάρμοσαν ένα εμπορικά διαθέσιμο σύστημα μικροσκοπίου σάρωσης που ανιχνεύει τη μετατόπιση  $t(9;22)(q34;q11)$  στους μεσοφασικούς πυρήνες λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Η εν λόγω μετατόπιση γίνεται μεταξύ του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 9 και του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 22 και εμφανίζεται σε αιματολογικές κακοήθειες και κυρίως στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία. Η αυτόματη ανάλυση χωρίζεται σε δύο σκέλη: στην ανίχνευση του FISH σήματος και στην κατάτμηση του κυτταρικού πυρήνα. Στο πρώτο σκέλος χρησιμοποιείται ένας μετασχηματισμός μορφής top-hat (Malpica, et al., 1997). Οι πυρήνες

τμηματοποιούνται χρησιμοποιώντας ένα γρήγορο αλγόριθμο που στηρίζεται στο περίγραμμα, όπου οι επικαλυπτόμενοι πυρήνες απορρίπτονται. Παρόλο ότι τα ψευδώς θετικά και αρνητικά αποτελέσματα ήταν ίδια συγκρινόμενα με τη μη αυτόματη ανάλυση, η διεπιστημονική μεταβλητότητα αποφεύχθηκε χρησιμοποιώντας το αυτόματο σύστημα οδηγώντας σε στατιστική ακρίβεια.



Εικόνα 12: Εικόνες φυσιολογικής και λανθασμένης ερμηνείας λόγω λάθους στην αναγνώριση του σήματος

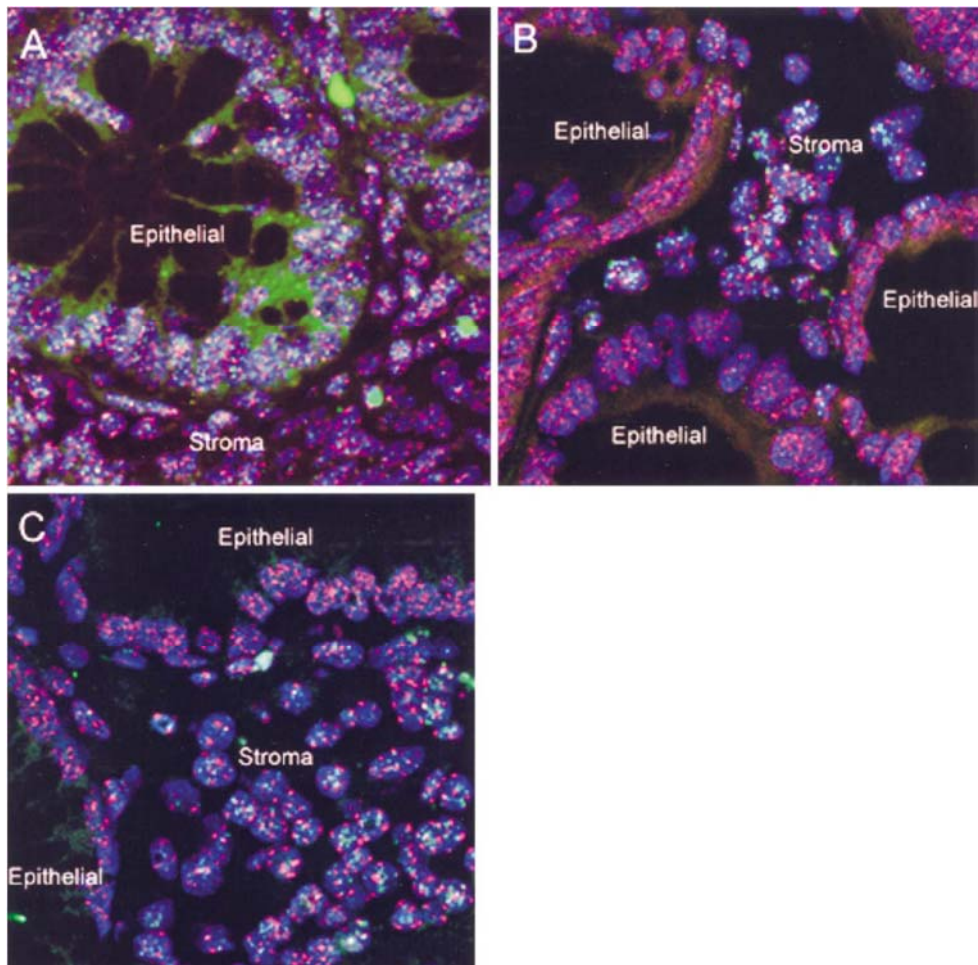
Στην εικόνα 12 οι Kajtár et al. (Kajtár, et al., 2006) μας παραθέτουν τις δυσκολίες στην αναγνώριση σημάτων. Έτσι στην εικόνα A έχουμε ένα φυσιολογικό σήμα (δύο κόκκινα και δύο πράσινα) ενώ στην εικόνα B έχουμε περίπτωση μετατόπισης με σύντηξη σήματος (ένα πράσινο ένα κόκκινο και ένα μεικτό πράσινο-κόκκινο σήμα). Στην εικόνα C παρατηρούμε μία περίπτωση σύντηξης πυρήνων. Στην εικόνα D βλέπουμε ότι το σύστημα αναγνωρίζει 8 πράσινα σήματα αφού δεν μπορεί να τα ξεχωρίσει από το φόντο. Στην εικόνα E το σύστημα αναγνωρίζει ένα κόκκινο σημείο ενώ στην πραγματικότητα είναι δύο σε πολύ μικρή απόσταση μεταξύ τους. Τέλος, στην εικόνα F αναγνωρίζονται τρία σήματα με κόκκινο χρώμα ενώ στην πραγματικότητα έχουμε δύο (περίπτωση διαχωρισμού σήματος).

Οι Lerner et al. (Lerner, 2004), (Lerner, et al., 2007) ανέπτυξαν μία διαφορετική προσέγγιση αυτόματης ανάλυσης εικόνας FISH ανεξάρτητη από αυτο-εστιακούς μηχανισμούς. Στη μέθοδό τους τα τρία χρωματικά κανάλια αναλύονται ξεχωριστά, ενώ έμφαση δίνεται στην επιλογή των χαρακτηριστικών χρησιμοποιώντας ανεξάρτητες ομάδες χαρακτηριστικών όπως μέγεθος, σχήμα, ένταση και χρώμα. Η ταξινόμηση βασίζεται σε ιεραρχικά νευρωνικά δίκτυα καθώς και στη μέθοδο Bayesian (Lerner, et al., 2007). Οι συγγραφείς προσπάθησαν να ταξινομήσουν τα σήματα σε τέσσερις κατηγορίες: πραγματικό κόκκινο, ψεύτικο κόκκινο, πραγματικό πράσινο, και ψεύτικο πράσινο, μετά από τρεις στρατηγικές ταξινόμησης. Στην πρώτη στρατηγική, η επονομαζόμενη μονολιθική τα σήματα ταξινομούνται στις τέσσερις κατηγορίες χρησιμοποιώντας μοναδικό νευρωνικό δίκτυο. Στην δεύτερη, η λεγόμενη ανεξάρτητη, πρώτα τα σήματα χωρίζονται σε κόκκινα και πράσινα με τη χρήση χρωματικού δικτύου και έπειτα σε πραγματικά και ψεύτικα με τη χρήση δικτύου πραγματικότητας. Η τελική ταξινόμηση του σημείου είναι αποτέλεσμα κοινής απόφασης και των δύο δικτύων. Στην τρίτη στρατηγική, την συνδυασμένη, τα σήματα χωρίζονται σε κόκκινα και πράσινα χρησιμοποιώντας δίκτυο χρώματος. Αναλόγως με τα αποτελέσματα, με τη χρήση δικτύου για πραγματικό κόκκινο και πραγματικό πράσινο, στη συνέχεια ταξινομούνται σε πραγματικό και ψεύτικο κόκκινο και πράσινο. Οι ίδιοι συγγραφείς έχουν χρησιμοποιήσει και naive Bayesian classifier αντί νευρωνικών δικτύων παρόλο ότι το πρώτο είναι απλό αλλά κατώτερο από τις άλλες τεχνικές (Lerner, 2004). Αυτή η κατωτερότητα οφείλεται στην εξάρτηση από τα επιλεγμένα χαρακτηριστικά.

Οι Chawla et al. (Chawla, et al., 2004) ανέπτυξαν ένα αυτόματο σύστημα ανάλυσης FISH σημάτων δειγμάτων εγκεφαλικού ιστού. Οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν αρκετούς αλγόριθμους για αυτόματη 3D κατάτμηση πυρήνων και FISH ποσοτικοποίηση. Αυτοί οι αλγόριθμοι έχουν οργανωθεί και συνδυαστεί κάτω από μία γραφική διεπαφή χρήστη, που επονομάστηκε «3D-catFISH». Ομοεστιακές εικόνες λαμβάνονται σε πολλαπλά φασματικά κανάλια και φορτώνονται στον υπολογιστή. Το πυρηνικό κανάλι αντιπροσωπεύει τους αντιχρωστικούς πυρήνες και τμηματοποιούνται πρώτα χρησιμοποιώντας έναν 3D watershed αλγόριθμο (Chawla, et al., 2004), ακολουθούμενος από μια

συγχώνευση περιοχής των πυρήνων βάσει μοντέλων. Το φόντο απορρίπτεται με αλγόριθμους συσσώρευσης. Ενδοπυρηνικά και κυτταροπλασματικά FISH σήματα εντοπίζονται και μετρούνται χρησιμοποιώντας τα κανάλια φθορισμού. Κατά τη διάρκεια της τμηματοποίησης των πυρήνων, οι συγγραφείς αντιμετώπισαν ένα πρόβλημα λόγω των διαστρωμάτων των κυττάρων που συχνά οδηγούν στην εμφάνιση μέσα στην εικόνα επικαλυπτόμενων αντικειμένων σε στοίβες. Οι συγγραφείς ανέπτυξαν έναν αλγόριθμο που ονόμασαν «gradient-weighted distance transform», ο οποίος συνδυάζει υποδείξεις διαχωρισμού αντικείμενου από γεωμετρικά και συνθήματα έντασης μέσα στις εικόνες. Η ταξινόμηση των FISH σημάτων εκτελέστηκε από έναν αποτελεσματικό αλγόριθμο, που προσδιορίζει κατά πόσον αναγνωρίσιμα FISH σήματα βρίσκονται στον πυρήνα των κυττάρων ή στο κυτταρόπλασμα. Στη μελέτη αναφέρεται ότι τα αποτελέσματα επικύρωσης εμφάνισαν 96,5% αντιστοιχία με τη συναίνεση εμπειρογνώμονα.

Οι O'Sullivan et al. (O'Sullivan, et al., 2004) ανέπτυξαν μια μέθοδο για να αξιολογήσουν το μήκος των τελομεριδίων στις ποσοτικές FISH (QFISH) εικόνες από καλλιεργημένα κύτταρα ανθρώπινων ιστών του γαστρεντερικού σωλήνα. Η κατάτμηση της εικόνας DNA έγινε με βάση έναν watershed αλγόριθμο και οι ανιχνευθέντες πυρήνες διακρίθηκαν με μη αυτόματο τρόπο από λοιπές επιθηλιακές ή στρωματικές ομάδες. Τρεις μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για να αναλυθεί το πράσινο (τελομερίδιο) και σε ορισμένες περιπτώσεις το κόκκινο (κεντρομερίδιο) χρώμα της έντασης του φθορισμού εντός κάθε πυρήνα. Η πρώτη μέθοδος, επονομαζόμενη φθορισμός διόρθωσης φόντου, βασίζεται στη σύγκριση της διαφοράς μεταξύ της έντασης από τα φωτεινότερα στα ελάχιστα φωτεινά εικονοστοιχεία σε κάθε πυρήνα. Στη δεύτερη μέθοδο, που περιλαμβάνει την εύρεση σημείου, τα τελομεριδικά (πράσινο) ή κεντρομεριδικά (κόκκινο) σημεία αναγνωρίζονται χρησιμοποιώντας έναν αλγόριθμο watershed. Στην τρίτη μέθοδο, που ονομάστηκε καμπύλη αφαίρεσης φόντου, οι συγγραφείς δημιούργησαν το ιστόγραμμα έντασης των εικονοστοιχείων για κάθε πυρήνα, όπου η κορυφή του φθορισμού του πυρηνικού φόντου θεωρείται ως η κατάσταση λειτουργίας του πράσινου (ή κόκκινου) ιστογράμματος.



Εικόνα 13: Παράδειγμα QFISH

Στην εικόνα 13 φαίνεται ένα παράδειγμα QFISH. Στην εικόνα A φαίνονται ίδια ποσοστά πράσινων (τελομερών) και κόκκινων (κεντρομεριδίων) σημάτων σε επιθήλιο και στρώμα από ιστικό δείγμα εντέρου. Στην εικόνα B και C φαίνεται σαφώς η υπεροχή των πράσινων σημάτων στο στρώμα έναντι του επιθηλίου με ίδια κόκκινα σήματα, πράγμα που συνεπάγεται ελάττωση των τελομερών σε δείγματα με αδένωμα εντέρου και οισοφάγου Barrett's. Η σύγκριση των τριών μεθόδων κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος εύρεσης σημείου είναι η πιο υπολογιστικά απαιτητική και έχει τη μεγαλύτερη μεταβλητότητα, ενώ ο φθορισμός διορθωμένου φόντου εφαρμόζεται καλύτερα σε τμήματα ιστού. Όπως αναφέρουν οι συγγραφείς, οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν με τις

προτεινόμενες μεθόδους ανάλυσης είναι ακριβείς, αναπαραγωγίμες και κλινικά εφαρμόσιμες.

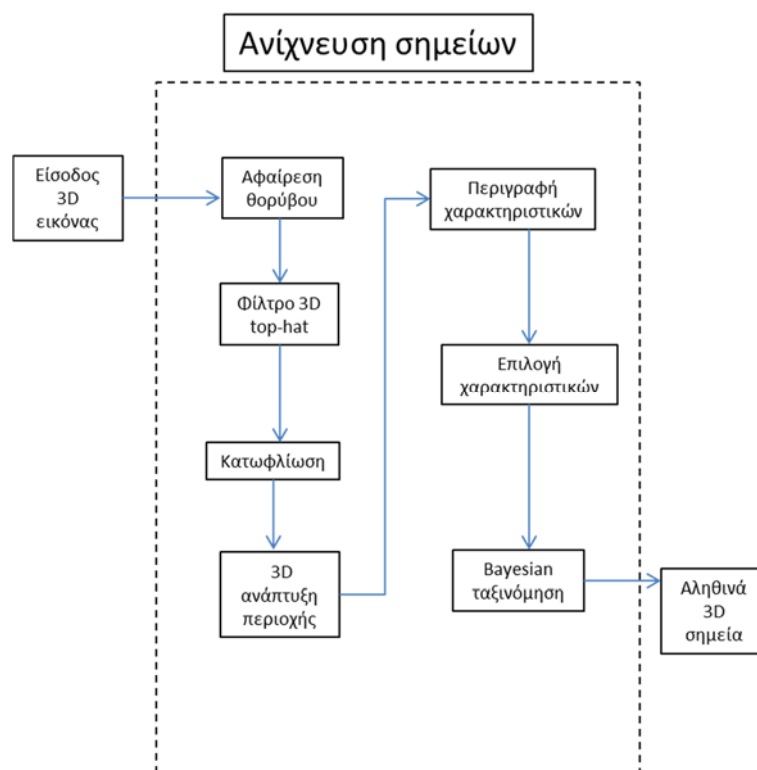
Οι Raimondo et al. (Raimondo, et al., 2005), βάσει του δυναμικού της περαιτέρω ανάπτυξης των συστημάτων για την αυτοματοποιημένη κυτταρική ανάγνωση FISH εικόνων, πρότειναν έναν πολυσταδιακό αλγόριθμο για την αυτόματη ταξινόμηση FISH εικόνων από καρκίνο του μαστού. Οι συγγραφείς άρχισαν εφαρμόζοντας ένα φίλτρο top-hat για τον εντοπισμό σημείων. Στη συνέχεια, ένα δυαδικό κατώφλι εφαρμόστηκε στα κανάλια των δύο εξόδων. Ακόμη και η καλύτερη επιλογή κατωφλίου δεν είναι αρκετή για να απομονώσει όλα τα αληθινά σημεία από τα ψευδή χρησιμοποιώντας μόνο το κόκκινο ή το πράσινο κανάλι έντασης. Έτσι, ένα πρότυπο σημείο υπολογίζεται για κάθε κανάλι. Για να μετρηθεί η ομοιότητα μεταξύ κάθε υποψήφιου σημείου και του σημείου προτύπου, χρησιμοποιείται συσχέτιση διασταύρωσης. Τέλος, για κάθε εντοπισμένο σημείο, ένα μέτρο αντίθεσης έντασης καναλιού χρησιμοποιείται για απόρριψη σημείων που το σχήμα είναι πολύ παρόμοιο με του προτύπου, αλλά έχουν πιο χαμηλό κανάλι έντασης αντίθεσης σε σχέση με τα περιβάλλοντα εικονοστοιχεία, καθιστώντας τα αόρατα στο ανθρώπινο μάτι. Κατά την κατάτμηση του πυρήνα, για να μειωθεί η ανομοιογένεια μεταξύ των σκοτεινών και πιο φωτεινών περιοχών εφαρμόστηκε ένα στάδιο διόρθωσης της μη γραμμικότητας. Κατόπιν εφαρμόστηκε ο αλγόριθμος Otsu (Otsu, 1979) για να προσδιοριστεί το κατώφλι για την αρχική κατάτμηση των πυρήνων. Το τελευταίο βήμα του αλγόριθμου της κατάτμησης του πυρήνα περιλαμβάνει watershed μετασχηματισμό, που εφαρμόζεται για την ανίχνευση ορίων σε επικαλυπτόμενα συμπλέγματα πυρήνων. Στο βήμα αυτό, πρώτα εφαρμόζεται ο μετασχηματισμός απόστασης στην δυαδική εικόνα που λαμβάνεται από το προηγούμενο βήμα. Αναφέρεται από τους συγγραφείς ότι η συνολική απόδοση του αλγόριθμου για την ταξινόμηση με βάση το κύτταρο σε αυτές τις περιπτώσεις έδειξε την ικανότητά του προτεινόμενου συστήματος να διακρίνει όλες τις θετικές και αρνητικές περιπτώσεις.

Οι Ram et al παρουσίασαν έναν αυτόματο αλγόριθμο για την κατάτμηση και τον εντοπισμό των σημείων σε FISH εικόνες από κύτταρα ωοθηκών των *Drosophila*

melanogaster (Ram, et al., 2012). Ο αλγόριθμος αποτελείται από δύο στάδια (διάγραμμα 2):

- 1) κατάτμηση σημείου και
- 2) ταξινόμηση σημείου.

Η κατάτμηση σημείου αποτελείται από 3D ανισότροπο λείανση για να αφαιρεθεί η επίδραση του θορύβου, ένα φίλτρο 3D top-hat για να εκπροσωπεί καλύτερα τα στοιχεία του προσκηνίου, δυαδικό κατώφλι, και 3D ανάπτυξη περιοχής. Η κατάτμηση δεν καταργεί την λανθασμένη κατάταξη που προκαλείται από το βήμα του δυαδικού κατωφλιού, έτσι θα μπορούσε κάποιος να κατατάξει το προκύπτον τμηματικό σημείο και να διακρίνει το αληθινό από το ψευδές. Για να συμβεί αυτό, περιγράφετε ένα σύνολο χαρακτηριστικών σημείων, όπως όγκος, μέσος όρος της έντασης, υφή, και αντίθεση καθώς και η χρήση ενός Bayesian ταξινομητή για να ταξινομήσει τα σήματα. Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι συγκρινόμενο με άλλα συστήματα βρέθηκε καλύτερο τόσο σε απόδοση όσο και σε ακρίβεια και σε ταχύτητα.



Διάγραμμα 2: Στάδια αυτόματης ανίχνευσης 3D σημείων κατά Ram et al (Ram, et al., 2012)

### 3.2.4 Κατάτμηση μεμονωμένου πυρήνα

Από τα προαναφερθέντα συμπεραίνουμε ότι η κατάτμηση των πυρήνων πραγματοποιείται βάσει της αντιχρωστικής εικόνας χρησιμοποιώντας διαφορετικές εντάσεις και μορφολογικές παραμέτρους, όπως κατώφλι έντασης σχετικής αντιχρωστικής, ελάχιστες και μέγιστες περιοχές αντικειμένων, μέγιστο βάθος κοιλότητας, και μέγιστη αναλογία διαστάσεων ή εκκεντρικότητα των αντικειμένων. Μετά την αρχική κατάτμηση, κυτταρικά συγκρίμματα και αντικείμενα με μη ειδική αντιχρωστική πρέπει να αποκλείονται από την περαιτέρω ανάλυση, ενώ υπάρχουν αμφιλεγόμενα ζητήματα όσον αφορά τις κυτταρικές συναθροίσεις. Ορισμένες ομάδες προτιμούν να διαχωρίσουν τους συσσωρευμένους πυρήνες, χρησιμοποιώντας, για παράδειγμα, ένα αλγόριθμο watershed (Chawla, et al., 2004), (Lin, et al., 2003), (Raimondo, et al., 2005), ενώ άλλοι αποκλείουν εξ ολοκλήρου τα πυρηνικά συμπλέγματα (Carrell & Emery, 2008), (Johnson, et al., 2007), (Kajtár, et al., 2006). Στην πρώτη μέθοδο μειώνεται το ποσοστό απώλειας κυττάρων, ωστόσο, ο διαχωρισμός των πυρήνων που έρχονται σε επαφή μεταξύ τους είναι από μόνος του μια πηγή σφάλματος επειδή η διαδικασία συχνά περικόπτει σε κομμάτια τα μεμονωμένα κύτταρα με πολυκατάτμητους πυρήνες (π.χ. κοκκιοκύτταρα). Αυτό το ζήτημα δεν παρουσιάζεται στην δεύτερη περίπτωση, αλλά ο αποκλεισμός κυτταρικών συσσωρεύσεων μπορεί να οδηγήσει σε στρέβλωση του αποτελέσματος, διότι διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι έχουν διαφορετική ικανότητα συνάθροισης (π.χ. τα καρκινικά κύτταρα συγκολλώνται μεταξύ τους). Αντίθετα, σύμφωνα με ορισμένες ερευνητικές εργασίες ο αποκλεισμός των κυττάρων σε αυτό το βήμα δεν έχει αντίκτυπο στο τελικό αποτέλεσμα της ανάλυσης (van de Rijke, et al., 1996). Ως εναλλακτική λύση, η μη-αυτόματη κατάτμηση μπορεί να συνδυαστεί με αυτόματη προκειμένου να αποφέρει καλύτερο αποτέλεσμα στην πυρηνική ανάλυση (Kozubek, et al., 2001).

### 3.2.5 Κατάτμηση των κυτταρικών πυρήνων σε δείγματα ιστών

Σε ιστολογικά δείγματα, οι πυρήνες των κυττάρων δεν μπορούν να τμηματοποιηθούν σωστά, έτσι οι περιοχές αυτές πρέπει να καθορίζονται κατά την αυτόματη ανάλυση. Η δειγματοληψία μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους. Η μέθοδος “tile sampling” (δειγματοληψία με πλακίδια) προσπαθεί να βρει μεμονωμένους πυρήνες στον ιστό με την τοποθέτηση μικρών “πλακιδίων” για τα αντικείμενα αντιχρωστικής ξεκινώντας από τα εικονοστοιχεία υψηλότερης έντασης και καταλήγοντας σε εικονοστοιχεία έντασης από προκαθορισμένο κατώφλι. Το μέγεθος των πλακιδίων επιλέγεται να είναι περίπου ίσο με τη μέση διάμετρο ενός κυτταρικού πυρήνα (Reichard, et al., 2006). Το σήμα FISH αυτών των πλακιδίων αναλύεται όπως εάν τα πλακίδια ήταν πυρήνες κυττάρων. Μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι τα εξής (Lorch, et al., 2002):

- το εύρος της αντίθεσης και μέσης τιμής έντασης των διαφορετικών FOV είναι ετερογενές, έτσι εικόνες που περιέχουν πολύ υψηλής έντασης αντιχρωστική θα οδηγήσουν στον αποκλεισμό ενός σημαντικού ποσοστού πυρήνων,
- το μέγεθος του πυρήνα μπορεί να ποικίλλει από δείγμα σε δείγμα, ειδικά εάν περιέχουν ένα μείγμα από νεοπλασματικά και μη-νεοπλασματικά κύτταρα. Πάρα πολύ μεγάλα ή πολύ μικρά πλακίδια θα δυσκολέψουν την ερμηνεία του σήματος,
- λόγω του στρόγγυλου σχήματος και της υψηλής πυκνότητας των πυρήνων, μπορεί να επιτραπεί η επικάλυψη των πλακιδίων, έτσι το ίδιο FISH σήμα μπορεί να αναλυθεί περισσότερο από μία φορά.

Μια άλλη δειγματοληπτική μέθοδος είναι η “grid sampling” (δειγματοληψία πλέγματος/δικτύου) η οποία αναλύει μικρές περιοχές του FOV που ονομάζονται μονάδες δικτύου. Αυτές οι μονάδες τοποθετούνται σε όλο το FOV σε τακτά χρονικά διαστήματα ανεξαρτήτως της έντασης της αντιχρωστικής. Τα FISH σήματα μέσα στα πλέγματα αναλύονται χωριστά, εφόσον εμπίπτουν στην αντιχρωστική των περιγραμμάτων των αντικειμένων. Σε σύγκριση με τη «tile sampling», η «grid sampling» είναι λιγότερο επηρεασμένη από τις διακυμάνσεις

της έντασης του φθορίζοντος φόντου που προκαλείται από το πάχος των τμημάτων του ιστού και την επικάλυψη των πυρήνων, τα οποία αποτελούν σημαντικές δυσκολίες κατά τη διάρκεια της ανάλυσης FISH (Alpár, et al., 2008). Ως τρίτη προσέγγιση, όλο το FOV μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μονάδα της αυτόματης ανάλυσης. Υπάρχουν εφαρμογές μέτρησης της αναλογίας των FISH σημάτων με διαφορετικό χρώμα χωρίς διαίρεση του FOV (Grigoryan, et al., 2002). Η δεύτερη και η τρίτη προσέγγιση οδηγούν σε μια ανάλυση που βασίζεται στις περιοχές, αντί να βασίζεται στο κύτταρο που είναι ένα σαφές μειονέκτημα αυτών των μεθόδων. Ωστόσο, ο προσδιορισμός των πυρήνων σε δείγματα ιστών εξακολουθεί να προκαλεί σημαντικές δυσκολίες, όχι μόνο για την αυτόματη αλλά και για την μη-αυτόματη κατάτμηση (Ventura, et al., 2006). Επιπλέον, στις περισσότερες περιπτώσεις, η FISH ανάλυση στα τμήματα ιστού δεν αποσκοπεί στην εξεύρεση μεμονωμένων άτυπων κυττάρων, αλλά μάλλον, στον καθορισμό θετικότητας σήματος που αντιστοιχεί σε κυτταρικές διηθήσεις ύποπτες για νεοπλασία.

### 3.2.6 Ανίχνευση σήματος FISH

Η σωστή ανίχνευση του FISH σήματος είναι η μεγαλύτερη πρόκληση για ένα αυτοματοποιημένο σύστημα. Μετά τη διόρθωση και βελτίωση του φόντου, τα σήματα αναγνωρίζονται με βάση την αντίθεση, την ένταση, τη σχετική ή απόλυτη περιοχή, και την ελάχιστη απόσταση μέχρι το άλλο σήμα με το ίδιο χρώμα. Από τη στιγμή που το μέγεθος, το σχήμα, και η ένταση των σημάτων μπορεί να διαφέρουν σημαντικά ακόμη και μέσα στον ίδιο πυρήνα, ο διαχωρισμός τους από τεχνητά σφάλματα και από ειδικούς θορύβους δεν είναι πάντα δυνατός. Περαιτέρω πηγές δυσκολιών είναι η ανεπαρκής υβριδοποίηση, η παρουσία διαιρεμένων σημάτων, και ο τυχαίος χρωματισμός των σημάτων με το ίδιο χρώμα (Truong, et al., 1997).

Κατά τη διερεύνηση πυρήνων που περιλαμβάνουν ιδιαίτερα ενισχυμένα γονίδια, διάφορα συμπλέγματα δημιουργούν προβλήματα στις τυποποιημένες μεθόδους μέτρησης σημείων. Αυτά παρουσιάζονται συχνά σε δείγματα ιστών (όπως, ενίσχυση του HER2 και N-myc γονιδίων) κάνοντας ακόμα πιο δύσκολη την

ανάλυση. Στην περίπτωση αυτή, ένας πιθανός τρόπος αξιολόγησης είναι να μετρηθεί η συνολική ένταση του σήματος και στη συνέχεια να διαιρεθεί με την αξία που χαρακτηρίζει έναν μη-ενισχυμένο ανιχνευτή αναφοράς (Narath, et al., 2005), (Allalou & Wählby, 2009). Ως εναλλακτική λύση, επίσης μπορεί να υπολογιστεί ο αριθμός των μεμονωμένων αντιγράφων του γονιδίου στόχου που παρουσιάζονται μέσα στο σύμπλεγμα (π.χ., χρησιμοποιώντας τετραγωνική παλινδρόμηση), έτσι το ποσοστό των γονιδίων στόχου και αναφοράς μπορεί να ποσοτικοποιηθεί βάσει διακριτού αριθμού σήματος (Grigoryan, et al., 2002), (Lerner, et al., 2007), (Lorch, et al., 2002). Δημοσιευμένα δεδομένα δείχνουν ότι και οι δύο προσεγγίσεις είναι κατάλληλες για διαγνωστικές ρυθμίσεις.

Τέλος, τμήματα ιστού συχνά περιέχουν ένα διάχυτο μείγμα των φυσιολογικών και νεοπλασματικών κυττάρων, οδηγώντας στην υποεκτίμηση του ποσοστού του γονιδιακού πολλαπλασιασμού. Αυτό το ζήτημα είναι επιλύσιμο με την ανάλυση της κοινής κατανομής της ενισχυμένης μέτρησης ανά πλακίδιο και της μέτρησης αναφοράς σημείου (Piper, et al., 2002). Κύτταρα με ψευδώς ανιχνεύσιμα σήματα θα πρέπει να αποκλειστούν εκτός από ορισμένες ειδικές περιπτώσεις. Ο αντίστοιχος κανόνας εφαρμόζεται και σε πυρήνες χωρίς FISH σήματα, εκτός αν η γενική έλλειψη ποιότητας προκαλεί λανθασμένους στόχους, και λάθη που συμβαίνουν σε διαφορετικά κανάλια που είναι ουσιαστικά ανεξάρτητα, δημιουργώντας έτσι ένα συνολικό ποσοστό σφάλματος που μοιάζει με την αξία του μαθηματικού τους πολλαπλασιασμού (Kajtár, et al., 2006). Αυτό στην πραγματικότητα θα μπορούσε να οδηγήσει σε εκπληκτικά χαμηλή ακρίβεια ανάλυσης σε περιπτώσεις ανάλυσης με πολλαπλούς ανιχνευτές (Alpár, et al., 2007). Ωστόσο, λόγω των συνήθως σύνθετων διαγνωστικών κριτηρίων αυτών των σημάτων, επηρεάζεται πολύ λιγότερο η κλινική αποτελεσματικότητα (Pajor, et al., 2012b).

Οι κυτταρικοί πυρήνες είναι τρισδιάστατα αντικείμενα, κατά συνέπεια ένα μη αμελητέο υποσύνολο των σημάτων χάνεται, αφού είναι εντοπισμένο μέσα από μία ανάλυση 2D εστίασης. Το πρόβλημα προκύπτει ειδικά σε περίπτωση χρήσης αντικειμενικών φακών με χαμηλό DOF. Δεδομένου ότι αυτό το σφάλμα προκαλεί αμφισβητούμενα αποτελέσματα, η λήψη εικόνας σε διαφορετικά πλάνα εστίασης και η κατασκευή των εικόνων εμφανίζοντας όλα τα FISH σήματα αποτελούν στις μέρες μας τις δύο πιο βασικές απαιτήσεις (Alpár, et al., 2008),

(Erlecke, et al., 2009), (Kajtár, et al., 2006), (Konsti, et al., 2008), (Ntouroupi, et al., 2008). Η φθορίζουσα μικροσκόπηση σε συνδυασμό με το αυτόματο στάδιο σάρωσης μπορεί να εκπληρώσει επαρκώς αυτές τις απαιτήσεις. Αυτή η προσέγγιση υποστηρίζεται συνήθως από την αποσυνέλιξη, μια υπολογιστική μέθοδο που αντισταθμίζει τους εγγενείς οπτικούς περιορισμούς του κάθε εύρους πεδίου ή ένα εργαλείο σάρωσης που χρησιμοποιεί μαθηματικούς αλγορίθμους.

Πιο προχωρημένες μεθοδολογίες οπτικής τμηματοποίησης (Conchello JA, 2005), (Mertz, 2011), (Ram, et al., 2012) αποκαλύπτουν τρισδιάστατες δομές των βιολογικών δειγμάτων όπως η μικροσκόπηση με ομοεστιακή σάρωση με λέιζερ και η μικροσκόπηση διέγερσης φθορισμού δύο-φωτονίων. Αυτές οι τεχνικές αποκτούν εικόνες από λεπτές διαφάνειες και ανοικοδομούν την τρισδιάστατη δομή επιτρέποντας επιδόσεις εικονικής ανατμηματοποίησης του δείγματος με οποιαδήποτε προαιρετικό προσανατολισμό. Η ομοεστιακή μικροσκόπηση απορρίπτει τη συμβολή του εκτός εστίασης φωτός σε κάθε πλάνο εικόνας ενώ η μικροσκόπηση δύο-φωτονίων δεν αναπαράγει καθόλου το εκτός εστίασης φόντο. Για FISH ανάλυση, μείζονα εγγενή προβλήματα και των δύο μεθόδων είναι η σχετικά αργή απεικόνιση που μπορεί να συνδυαστεί με μειωμένη αναλογία σήματος/θορύβου κατά τη ψηφιοποίηση πολύ λεπτών διαφανειών. Εκτός από τους τεχνικούς περιορισμούς, η πολυπλοκότητα και η τιμή είναι προφανώς οι λόγοι για τους οποίους οι τεχνικές αυτές δεν έχουν κατακτήσει σημαντικό έδαφος σε συνήθεις εφαρμογές. Ως εκ τούτου, ακόμη και ομοεστιακή μικροσκόπηση εφαρμόστηκε σε λιγότερο από το 10% του συνόλου FISH δημοσιευμένων μελετών, χωρίς να αναφέρουμε τις άλλες, πιο εξειδικευμένες προσεγγίσεις. Η χρησιμοποίηση δομημένου φωτισμού είναι μια υποσχόμενη και κυρίως λιγότερο δαπανηρή προσέγγιση, η οποία επίσης δίνει τη δυνατότητα τρισδιάστατης απεικόνισης (Mertz, 2011).

### 3.2.7 Αξιολόγηση σήματος

Εξετάζοντας ισορροπημένες ανακατατάξεις, η απόσταση μεταξύ FISH σημείων διαφορετικών χρωμάτων πρέπει να μετρηθεί για να αποκαλυφθεί το χωρικό

τους μοτίβο που επίσης έχει διαγνωστική σημασία. Ο τύπος του εφαρμοζόμενου ανιχνευτή (π.χ. ενιαίας-σύντηξης, διπλής-σύντηξης ή αποσυναρμολόγησης) καθορίζει ποια απόσταση (ή αποστάσεις) είναι σημαντική. Η απόκτηση τρισδιάστατης εικόνας είναι ιδιαίτερα σημαντική σε αυτό το βήμα, και έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τα λανθασμένα αποτελέσματα λόγω της 2D σύλληψης που προκαλείται από τον τυχαίο χρωματισμό των FISH σημάτων (Pajor, et al., 2012a). Κατά τη διερεύνηση αριθμητικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών ή ασύμμετρων διαρθρωτικών αλλαγών (προσθέσεις και ελλείψεις) σε πυρήνες, η ανάλυση των αποτελεσμάτων ανίχνευσης σήματος χρησιμοποιώντας διαγράμματα ή ιστογράμματα είναι ικανοποιητική, ενώ η αξιολόγηση των χωρικών μοντέλων δεν είναι απαραίτητη.

### 3.2.8 Χρόνος αξιολόγησης

Ο χρόνος αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό για την αξιολόγηση των αυτόματων μεθόδων ανάλυσης εικόνων FISH. Ο χρόνος αφορά το άθροισμα όλων των υποσταδίων όπως η σήμανση της ROI, η προσαρμογή του ψηφιακού κέρδους στην ένταση φθορισμού του δείγματος, η κίνηση του σταδίου, η αυτοεστίαση, η σύλληψη εικόνας (έκθεση), η αλλαγή του φίλτρου ή του μήκους κυμάτων φωτός, η αξιολόγηση των δεδομένων χρησιμοποιώντας ιστογράμματα, η διασκόρπιση γραφήματος, και η συλλογή αρχείου. Η ενσωμάτωση, η επεξεργασία και η ανάγνωση των διαδοχικών εικόνων συνήθως εκτελούνται ταυτόχρονα (Netten, et al., 1998). Η χρήση υψηλότερης μεγέθυνσης ασπρόμαυρης κάμερας αντί για έγχρωμη, ο αυξημένος αριθμός ανιχνευόμενων καναλιών και πλάνων εστίασης και η μεγέθυνση του ROI αυξάνουν το χρόνο ανάλυσης. Εάν καθορίζεται ο προς διερεύνηση μέγιστος αριθμός των κυττάρων, η πυκνότητα του δείγματος είναι επίσης ένας καθοριστικός παράγοντας (Netten, et al., 1997). Στα δημοσιευμένα άρθρα χρησιμοποιείται μεγάλη ποικιλία ταχυτήτων, από 0.18 ως 452.1 δευτερόλεπτα ανά κύτταρο, η οποία προκαλείται από διαφορές στον ορισμό που χρησιμοποιείται από κάθε ομάδα (Baumgartner, et al., 2001), (Johnson, et al., 2007). Σε πολλά άρθρα, δεν είναι σαφές ποια βήματα ακολουθήθηκαν πράγμα που κάνει τη σύγκριση αδύνατη. Τελικά, ακόμα

κι αν ο ορισμός είναι ασαφής, μπορεί να δηλώνεται ότι ο χρόνος που απαιτείται για την αυτόματη αξιολόγηση δεν υπερβαίνει ποτέ τον χρόνο της μη αυτόματης εξέτασης.

# Κεφάλαιο 4

## Εφαρμογές αυτόματης ανάλυσης

---

Το πιο αποδεικτικό στοιχείο που δείχνει τη δύναμη και την ευελιξία ενός διαγνωστικού εργαλείου είναι το φάσμα των εφαρμογών του. Η μη-αυτόματη ανάλυση FISH σαφώς έχει γίνει ένα απαραίτητο εργαλείο για την κλινική πρακτική κατά την τελευταία δεκαετία. Παράλληλα η αυτόματη ανάλυση όλο και κερδίζει έδαφος, πράγμα που αποδεικνύεται με την αύξηση των δημοσιευμένων άρθρων ανά έτος τόσο για τεχνικά θέματα όσο και για την ευελιξία αυτής της τεχνολογίας. Συγχρόνως, όλο και περισσότερες μελέτες δημοσιεύονται που ασχολούνται με την υπεροχή της αυτόματης ανάλυσης σε σχέση με την μη-αυτόματη. Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται κάποιες πρωτοποριακές εφαρμογές της αυτόματης ανάλυσης εικόνων FISH. Παράλληλα, θα περιγραφούν μερικά διαθέσιμα στο εμπόριο αυτόματα συστήματα ανάλυσης εικόνων FISH.

### 4.1 Πρωτοπόρες εφαρμογές

Πρώτες εργασίες σχετικά με την αυτοματοποιημένη αξιολόγηση FISH σημάτων δημοσιεύθηκαν στις αρχές της δεκαετίας του '90 ανεξάρτητα από δύο επιστημονικές ομάδες (Cremer, et al., 1992), (Nederlof, et al., 1992). Οι Cremer et al. (Cremer, et al., 1992) ανέλυσαν 131 προηγουμένως ψηφιοποιημένες εικόνες από θηλυκά ανθρώπινα λεμφοκύτταρα χαρακτηρισμένα με χρήση pXBR ανιχνευτή, που ανιχνεύει το κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος X. Οι πυρήνες επιλέχθηκαν με το μάτι για ψηφιοποίηση βάσει καθαρών FISH σημάτων. Τα διορθωμένα ποσοστά ταξινόμησης σε φυσιολογικά και παθολογικά κύτταρα βρέθηκαν 90% και 85% χρησιμοποιώντας META 4 και META 5 προγράμματα, αντίστοιχα. Τα συγκεκριμένα προγράμματα είναι προορισμένα για αυτόματη ανάλυση ψηφιακών εικόνων. Το γκρι επίπεδο και η περιοχή που μετρήθηκε

μέσα σε ένα ενιαίο κανάλι θεωρήθηκαν σήματα αναγνώρισης. Μεταξύ άλλων, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ψηφιοποίηση πρέπει να γίνεται απευθείας από το δείγμα και τα πυρηνικά όρια πρέπει να καθορίζονται πριν από την έναρξη της κατάρτισης του σήματος.

Οι Nederlof et al. (Nederlof, et al., 1992) χρησιμοποίησαν λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος για τον έλεγχο ικανότητας του συστήματος εικόνας tool command language (TCL)<sup>1</sup> να ποσοτικοποιήσει FISH σήματα. Επιπρόσθετα της αντιχρωστικής 4'6-διαμίδινο-2-φαινυλινδόλη (DAPI)<sup>2</sup>, οι περιοχές πέριξ του κεντρομεριδίου των χρωμοσωμάτων 1 και 7 επισημάνθηκαν με τις χρωστικές ισοθειοκυανικό αλλύλιο (FITC)<sup>3</sup> ή ισοθειοκυανική τετραμεθυλ-ροδαμίνη (TRITC)<sup>4</sup>. Οι χρόνοι έκθεσης για κάθε διαφάνεια και φλουοροφόρο καθορίστηκαν εμπειρικά με στόχο την μέγιστη ανάλυση σε γκρι επίπεδο. Διαχωρισμός της χρωστικής DAPI του πυρήνα από το φόντο πραγματοποιήθηκε με κατάρτιση βασισμένη σε ιστόγραμμα. Δεδομένα από λανθασμένα τμηματοποιημένους πυρήνες ή FISH κηλίδες, και επιπλέον πυρήνες με FISH κηλίδες εκτός εστίασης αποκλείονταν χειρωνακτικά. Η διαδικασία ανάλυσης εικόνας ήταν αυτοματοποιημένη χωρίς αλληλεπίδραση του χρήστη και επιτεύχθηκε η ακρίβεια 95%. Τα μείζονα προβλήματα προκλήθηκαν από ετερογενή φόντο των πυρήνων και τα περιορισμένα DOF που αντιμετωπίστηκαν με ψηφιακό φιλτράρισμα και τη χρήση αντικειμενικών φακών με χαμηλότερα αριθμητικά ανοίγματα, αντίστοιχα.

Αυτές οι πρωτοποριακές πρωτοβουλίες ξεκίνησαν μια εκτεταμένη τεχνική επανάσταση προσελκύοντας διάφορους εμπειρογνώμονες στον τομέα με διαφορετικό υπόβαθρο βασικών επιστημών. Φυσικοί, βιολόγοι, χημικοί και μαθηματικοί εργάστηκαν από κοινού σ' αυτόν τον ανεκμετάλλευτο τομέα, επικεντρώνοντας κυρίως σε βασικούς τομείς, όπως οπτική, βιοστατιστική και ψηφιακή τοπολογία. Στην πραγματικότητα, πολλές πρόωρες μελέτες δεν είχαν

---

<sup>1</sup> TCL είναι μια υψηλού επιπέδου, γενικής χρήσης, ερμηνευτική, δυναμική γλώσσα προγραμματισμού

<sup>2</sup> DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) είναι μία φθορίζουσα ουσία που συνδέεται ισχυρά με περιοχές DNA πλούσιες στο A-T ζεύγος αμινοξέων

<sup>3</sup> Fluorescein isothiocyanate (FITC) είναι παράγωγο της φλουορεσίνης και χρησιμοποιείται πολύ σαν χρωστική κυρίως στην κυτταρομετρία ροής

<sup>4</sup> isothiocyanate derivative (TRITC) είναι παράγωγο της ροδαμίνης με ίδια χρήση με το FITC αλλά σε πιο περιορισμένη κλίμακα

ακόμα στόχο να συγκρίνουν τα αποτελέσματα τους με εκείνα της μη αυτόματης ανάλυσης, αλλά αντιθέτως να διερευνήσουν διάφορες προσεγγίσεις μαθηματικής μορφολογίας για τη βέλτιστη αναγνώριση του αντικειμένου, με μια συγκριτική τάση. Παρά το γεγονός ότι επιτεύχθηκε γρήγορη τεχνολογική και υπολογιστική εξέλιξη, εργαλεία και λογισμικό αναπτύχθηκαν κατά τρόπο μη εναρμονισμένο.

Στα μέσα της δεκαετίας του '90, οι Tanke et al (Tanke, et al., 1995b), αναφέρουν ότι η εξέλιξη στο υλικό προηγήθηκε της ανάπτυξης του λογισμικού, ως εκ τούτου πρέπει να καταβληθούν προσπάθειες για τη βελτίωση του τελευταίου, ειδικά όσον αφορά την επεξεργασία πολυπαραγοντικών δεδομένων. Στη συνέχεια, για ένα σύντομο χρονικό διάστημα, η προσοχή στρεφόταν μάλλον σε αυτόματο *in situ* φθορισμό φωτεινού πεδίου και αρκετές εξελίξεις συμπεριλαμβανομένης της αυτόματης εξέλιξης των ιστολογικών δειγμάτων επιτεύχθηκαν πραγματικά διερευνώντας μη-φθορίζοντα δείγματα (van de Rijke, et al., 1996). Οι τεχνικές αυτές αφορούν *in situ* υβριδισμό χωρίς όμως φθορισμό. Στις περισσότερες των περιπτώσεων γινόταν χρήση χρωμογόνων ουσιών. Ο χρωμογόνος *in situ* φθορισμός (CISH) θα μπορούσε να είναι μια μέθοδος επιλογής όταν δεν είναι διαθέσιμο μικροσκόπιο φθορισμού και εφαρμόζονται μόνο ένας ή δύο διαφορετικοί ανιχνευτές. Παρά το γεγονός ότι, ακόμη και σήμερα, ο CISH εξακολουθεί να είναι μια ιδιαίτερη τεχνική, η κύρια προσοχή γρήγορα στράφηκε στις εφαρμογές φθορισμού.

Το 1997, δύο μελέτες ορόσημα δημοσιεύθηκαν σχετικά με την αυτόματη ανάλυση FISH από την ομάδα των Netten et al (Netten, et al., 1998), (Netten, et al., 1997). Οι μελέτες αυτές συχνά ακόμα χρησιμεύουν ως σημεία αναφοράς για την ανάπτυξη συστημάτων επειδή παρέχουν ολοκληρωμένη και λεπτομερής περιγραφή σχετικά με κάθε βήμα της καταμέτρησης σημείων. Επιπλέον, θέτουν κρίσιμα ζητήματα για την ανάλυση της ποιότητας του δείγματος, όπως χαμηλή πυκνότητα κυττάρων, ανομοιογενή διανομή κυττάρων, διαχωρισμός και επικάλυψη σημάτων.

Μέχρι το τέλος της δεκαετίας του '90, οι Adiga et al (Adiga & Chaudhuri, 1999) έκαναν τη πρώτη προσπάθεια να αναλύσουν FISH σημασμένα ιστικά τμήματα σε τρισδιάστατη εικόνα. Ποσοτικοποίησαν τα CEP7 σήματα σε ιστικά τμήματα πάχους 10 - 15  $\mu\text{m}$  από ασθενείς με καρκίνο προστάτη χρησιμοποιώντας

ομοεστιακή μικροσκόπηση και ημι-αυτόματη ανάλυση εικόνας και ανέφεραν αποτελέσματα αυτόματης καταμέτρησης σχεδόν συγκρίσιμα με αυτά της οπτικής καταμέτρησης (Rodenacker, et al., 1997).

Παράλληλα με την τεχνολογική ανάπτυξη, αναγνωρίστηκε ότι η ποιότητα των δειγμάτων έχει τεράστια επίδραση στην απόδοση των αυτόματων συστημάτων, έτσι έγιναν διάφορες προσπάθειες για να επιτευχθούν φωτεινότερα FISH σήματα χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους ενίσχυσης σήματος (Truong, et al., 1997).

Εκτός από τις πρώτες τεχνικές συγκριτικές μελέτες, αποτελέσματα της αυτόματης ανάλυσης υπόκειντο σχεδόν πάντα σε σύγκριση με τα αποτελέσματα μη-αυτόματης ανάλυσης λαμβάνοντας υπόψη τα τελευταία ένα ως σημείο αναφοράς. Η συσχέτιση μεταξύ των δύο τρόπων αξιολόγησης εκτιμήθηκε αρκετές φορές, και τελικά οδήγησε στην εισαγωγή των στατιστικών μεθόδων και της μαθηματικής διόρθωσης (μείωσης) των συστηματικών σφαλμάτων. Οι Ortiz de Solórzano et al. (Solórzano, et al., 1998) δοκίμασαν τη μέθοδο διόρθωσης Castleman's και διαπιστώθηκε ότι είναι χρήσιμη για τη βελτίωση της απόδοσης ενός αυτόματου συστήματος. Επιπλέον, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι δεν είναι απαραίτητη καμιά διόρθωση που βασίζεται στο δείγμα, εάν ένας επαρκώς υψηλός αριθμός κυττάρων, που παρασκευάζεται με έναν τυποποιημένο τρόπο, χρησιμοποιείται για τη διόρθωση.

## 4.2 Εύρος εφαρμογών

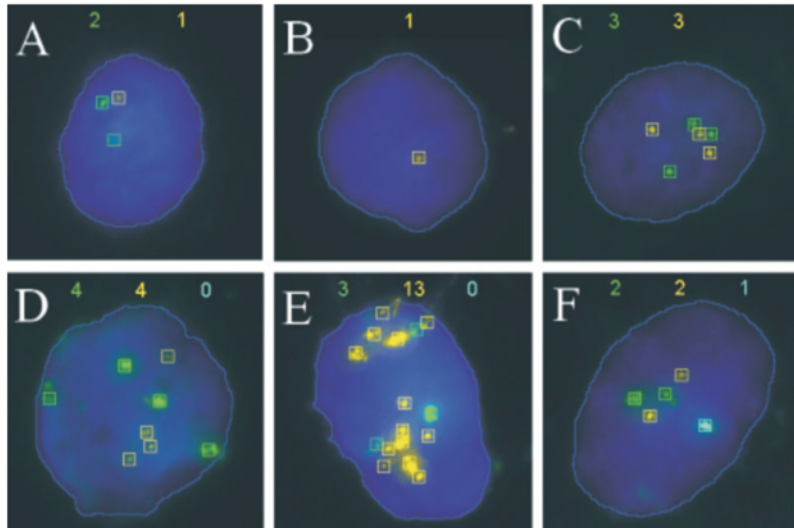
Ενώ η τεχνολογική εξέλιξη και η εξέλιξη της Πληροφορικής συνεχίστηκε με αμείωτους ρυθμούς κατά τα επόμενα χρόνια (Allalou & Wählby, 2009), (Baumgartner, et al., 2001), (Carrell & Emery, 2008), (Gudla, et al., 2008), (Gué, et al., 2005), (Iannuccelli, et al., 2010), (Kilpatrick, et al., 2004), (Klewes, et al., 2011), (Kozubek, et al., 1999), (Kozubek, et al., 2001), (Lorch, et al., 2002), (Méhes, et al., 2003), (Narath, et al., 2004), (Reljin, et al., 2011), (Shah, 2007), (Shimoni, et al., 2002), (Shirley, et al., 2011), (Stevens, et al., 2007), (Truong, et al., 2003), (Tubbs, et al., 2006), (Wang, et al., 2010), ήταν ακόμα περισσότερη η

έμφαση στις πρακτικές προσεγγίσεις και ένα ευρύ φάσμα κλινικών εφαρμογών εμφανίστηκε στις αρχές του 21ου αιώνα.

Στο πεδίο της κυτταρογενετικής του καρκίνου, η αυτόματη έρευνα της ενίσχυσης του γονιδίου HER2 ήταν η πιο συχνά δημοσιευμένη εφαρμογή, που πραγματοποιείται κυρίως σε δείγματα καρκίνου του μαστού (Ellis, et al., 2005), (Hicks & Tubbs, 2005), (Kilpatrick, et al., 2011), (Konsti, et al., 2008), (Moerland E, 2006), (Narath, et al., 2004), (Raimondo, et al., 2005), (Schunck & Mohammad, 2011), (Stevens, et al., 2007), (Theodosiou, et al., 2008), (Tubbs, et al., 2006), (Turashvili, et al., 2009). Με την εισαγωγή νέων στοχευμένων χημειοθεραπευτικών θεραπειών, ακριβής εκτίμηση της ενίσχυσης του γονιδίου HER2, όπως, η αναλογία των HER2 κηλίδων/σημείων και κεντρομεριδιακών σημάτων του χρωμοσώματος 17, έγινε σημαντικό ειδικά σε περίπτωση ασθενών με ασθενώς θετικό (Adiga & Chaudhuri, 1999) γονίδιο HER2. Σήματα που δεν έχουν τη μορφή κηλίδας ή σήματα σε επαφή ή επικαλυπτόμενα κάνουν τη μη αυτόματη ανάλυση κουραστική και δύσκολη που είναι πιθανώς ο λόγος γιατί πολλές ομάδες έχουν δείξει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την αυτόματη και την ποσοτική ανάλυση των HER2 FISH εικόνων.

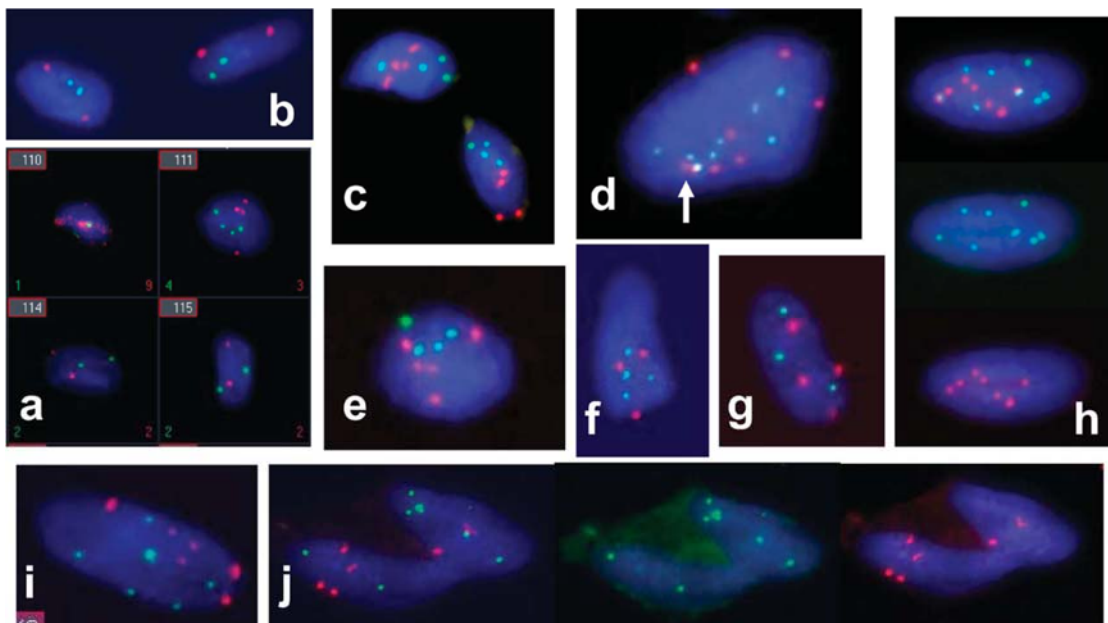
Οι Rygiel et al μελέτησαν χρησιμοποιώντας αυτόματη ανάλυση FISH την κατάσταση του γονιδίου HER2 σε κυτταρολογικό δείγμα διά μάκτρου από ασθενείς με οισοφάγο και βρήκαν τέλεια συμφωνία με τα αποτελέσματα της μη αυτόματης ανάλυσης (Rygiel, et al., 2007). Στην εικόνα 14 φαίνεται η ανάλυση εικόνας από δείγμα βλεννογόνου οισοφάγου. Στην εικόνα F φαίνεται ο πυρήνας με φυσιολογικά σήματα, ενώ στις υπόλοιπες φαίνονται πυρήνες με αριθμητικές διαταραχές. Πιο συγκεκριμένα στις εικόνες A και B έχουμε έλλειψη χρωμοσωμικού υλικού ενώ στις εικόνες C, D και E έχουμε τρισωμία (τριπλασιασμός χρωμοσώματος), τετρασωμία (τετραπλασιασμός χρωμοσώματος) και πολυπλοειδία (το πορτοκαλί σήμα φαίνεται πάνω από οκτώ φορές) αντίστοιχα.

Εκτός του γονιδίου HER2, η αυτόματη ανάλυση επίσης χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση διαφόρων γενετικών ανωμαλιών σε συμπαγείς όγκους. Οι Truong et al (Truong, et al., 2004) ανίχνευσαν αστάθειες στο χρωμόσωμα 1 σε κύτταρα καρκίνου του μαστού και αστάθειες στο χρωμόσωμα 3 σε όγκους του πνεύμονα χρησιμοποιώντας ανιχνευτές ειδικούς για τα αντίστοιχα χρωμοσωμικά σκέλη.



Εικόνα 14: Ανάλυση εικόνα κατά Rygiel et al (Rygiel, et al., 2007)

Οι Adiga και Chaudhuri (Adiga & Chaudhuri, 1999) εντόπισαν τρισωμία του χρωμοσώματος 7 σε δείγματα ιστών από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη η οποία παρέκκλιση είναι γνωστό ότι σχετίζεται με εξέλιξη της νόσου. Οι Hruska et al. (Hruska, et al., 2004) μελέτησαν τρεις διαφορετικούς τύπους όγκων περιβλήματος περιφερικών νεύρων χρησιμοποιώντας κεντρομεριδιακούς ανιχνευτές για τα χρωμοσώματα 7, 17, και 18 και παρατήρησαν διαφορετικές αναλογίες των κυττάρων με ανευσωμία σε καλοήθεις και κακοήθεις όγκοι.

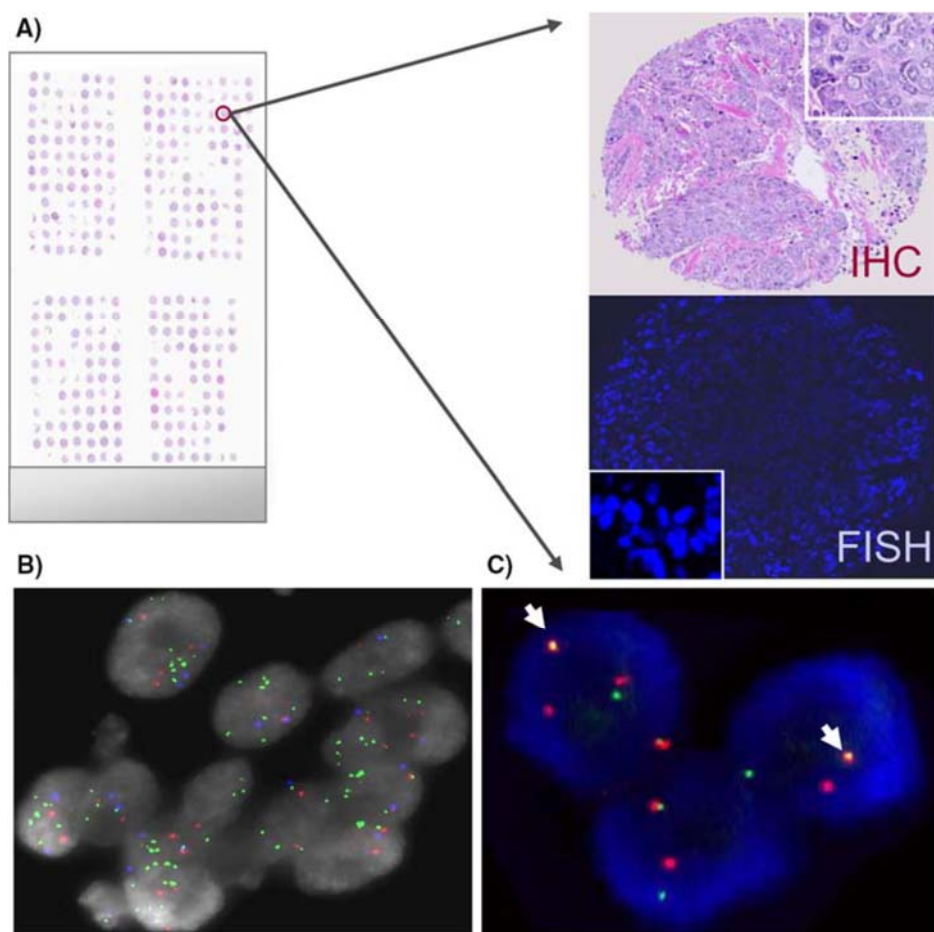


Εικόνα 15: Πολυπλοειδία

Από αυτήν τη μελέτη στην εικόνα 15 παρουσιάζονται παραδείγματα με πολυπλοειδία, δηλαδή αύξησης των χρωμοσωμικών σειρών.

Οι Brown και Huntsman εξέτασαν διαφάνειες μικροσυστοιχειών ιστού που περιείχαν δείγματα όγκου ωθηκών και του μαστού χρησιμοποιώντας τριχρωμικούς ανιχνευτές για τα γονίδια EMSY, CCND1 και την κεντρομεριδιακή περιοχή του χρωμοσώματος 11. Το γονίδιο EMSY σχετίζεται με κακή πρόγνωση και έχει βρεθεί στο 13% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού (Brown & Huntsman, 2007).

Ένα παράδειγμα FISH σε δείγμα μικροσυστοιχίας παρουσιάζεται στην εικόνα 16. Στην εικόνα Β παρουσιάζεται ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου με το πράσινο σήμα σε σχέση με το κόκκινο και το μπλε. Στο τμήμα C φαίνεται με τα βέλη μετατόπιση  $t(12;15)(p13;q26)$ .



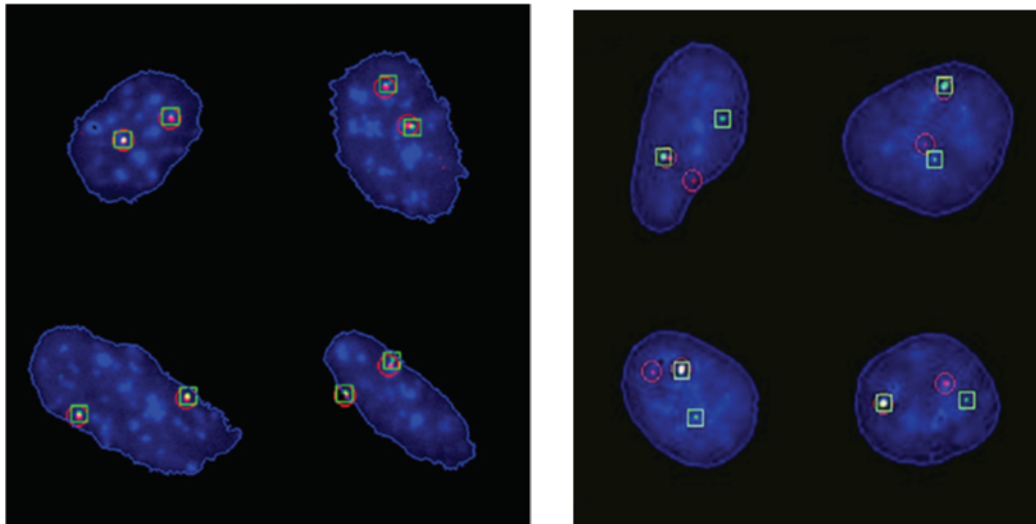
Εικόνα 16: Εφαρμογή ανάλυσης εικόνας FISH σε δείγμα μικροσυστοιχίας

Οι Pajor et al, (Pajor, et al., 2008), (Pajor, et al., 2011), (Pajor, et al., 2012b) μελέτησαν τις ανευσωμίες των χρωμοσωμάτων 3, 7 και 17 και την έλλειψη του χρωμοσώματος 16 (9p 21) σε κύτταρα ουρηθρικού επιθηλίου ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστης χρησιμοποιώντας μια πολύχρωμη προσέγγιση. Αποδείχθηκε ότι η αναλογία των FISH θετικών κυττάρων συσχετίζεται τόσο με το βαθμό όσο και με το στάδιο της νόσου, Έτσι η μέθοδος παρέχει έναν εναλλακτικό και αποτελεσματικό τρόπο για μη επεμβατικό καθορισμό αυτών των χαρακτηριστικών του συγκεκριμένου όγκου. Την ίδια μέθοδο χρησιμοποίησαν και οι Marganski et al. εξετάζοντας 3,000 περιστατικά (Marganski, et al., 2011).

Οι Seppo et al. (Seppo, et al., 2009) διερεύνησαν το διπλασιασμό της περιοχής 3q26 σε χαμηλού βαθμού πλακώδη ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση του τραχήλου της μήτρας, αποδεικνύοντας τη συσχέτιση της με αύξηση πιθανότητας για εξέλιξη σε υψηλού βαθμού δυσπλασία.

Οι Katz et al. (Katz, et al., 2008) μελέτησαν τις ανωμαλίες 3p22.1 και 10q22.3 σε δείγματα πτυέλων από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και καπνιστές υψηλού κινδύνου. Χρωμοσωμικές ανωμαλίες παρουσιάζοντουσαν τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα άτυπα επιθηλιακά κύτταρα των πτυέλων επιβεβαιώνοντας ότι οι κυτταρικές γενετικές ανωμαλίες του 3p22.1 και 10q22.3 αντικατοπτρίζουν ένα πεδίο καρκινογενετικού αποτελέσματος μέσα στα βρογχικά κύτταρα των ατόμων υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου.

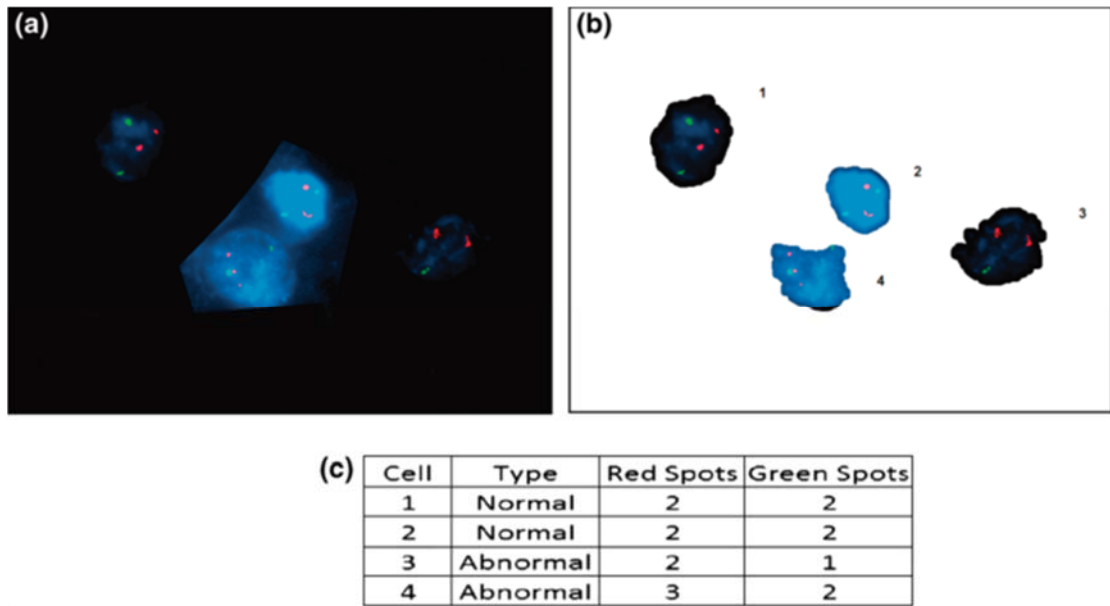
Οι Hieber et al. (Hieber, et al., 2011) διερεύνησαν κυτταροκαλλιέργειες από θηλώδη καρκίνους του θυρεοειδή για την παρουσία συγκεκριμένων γονιδιακών ανασυνδυασμών. Στην εικόνα 17 παρατηρούμε στο αριστερό τμήμα φυσιολογικά κύτταρα από θυρεοειδή αδένα με πυρήνα με δύο πράσινα και δύο κόκκινα σήματα. Στο δεξί τμήμα παρατηρούμε διαχωρισμό της μίας από τις δύο συντήξεις επομένως έχουμε μετατόπιση γονιδιακού υλικού.



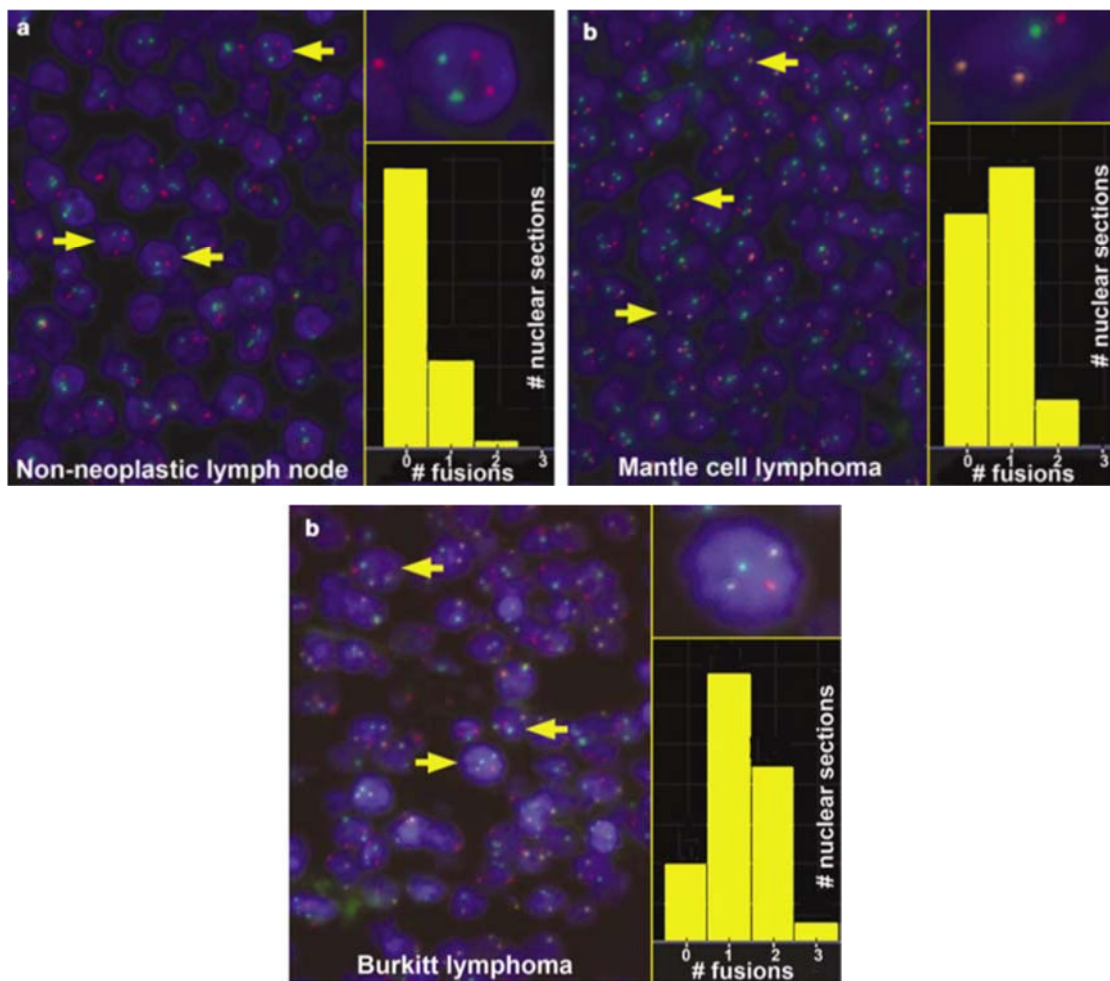
Εικόνα 17: Παράδειγμα φυσιολογικών και μη κυττάρων θυρεοειδούς

Οι Wang et al. (Wang, et al., 2010) εξέτασαν μονοσωμίες και πολυσωμίες των χρωμοσωμάτων 3 και X σε Τεστ-ΠΑΠ δείγματα από ασθενείς που είχαν διαγνωστεί με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αυτόματη μέθοδος παρουσίασε υψηλή συσχέτιση με τη μη-αυτόματη και μπορεί να αποτελέσει ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την ανίχνευση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σε πρώιμο στάδιο και να προβλέψει την εξέλιξη της νόσου. Στην εικόνα 18 φαίνεται από τη συγκεκριμένη μελέτη η ανάλυση τεσσάρων πυρήνων, η κατάτμηση τους και το τελικό αποτέλεσμα καταμέτρησης σημείων σε πίνακα.

Ισορροπημένες γενετικές παρεκκλίσεις σε ογκολογικές και αιματολογικές ασθένειες αντιπροσωπεύουν μια μοναδική πρόκληση για τα αυτόματα συστήματα. Η χρόνια μυελογενή λευχαιμία και η χιμαιρική πρωτεΐνη BCR/ABL1 αποτέλεσε την απαρχή των δημοσιευμένων εργασιών με πρώτους τους Kozubek et al., και Lukasova et al, που συστήνουν μια μέθοδο για τον σκοπό αυτό και δημοσιεύουν μια λεπτομερή περιγραφή για την αυτόματη αξιολόγηση (Lukášová, et al., 1997), (Kozubek, et al., 1999). Λόγω της εξέλιξης των ανιχνευτών μετατόπισης για την ανίχνευση θετικών BCR/ABL1 κυττάρων ακόμα και όταν αυτά βρίσκονται σε πολύ μικρή αναλογία, η μέθοδος αποτελεί στις μέρες μας βασικό κομμάτι της θεραπευτικής ανταπόκρισης και της παρακολούθησης ασθενών με χρόνια μυελογενή λευχαιμία (Erlecke, et al., 2009), (Knudson RA, 2007).



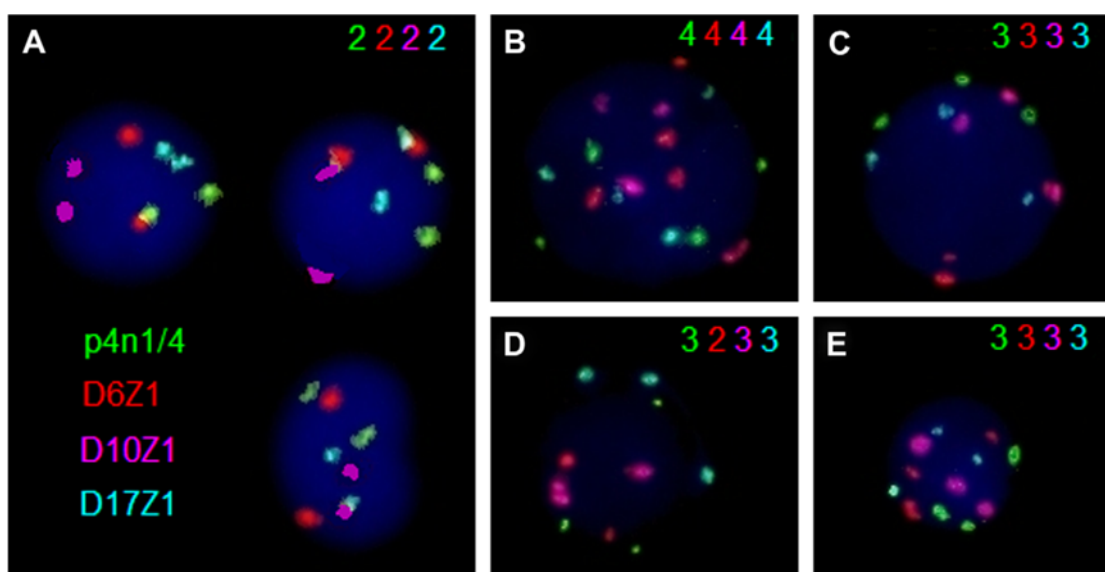
Εικόνα 18: Αυτόματη ανάλυση δείγματος τραχήλου μήτρας



Εικόνα 19: Ανάλυση δειγμάτων από λεμφώματα Β κυτταρικής αρχής

Οι Reichard et al. (Reichard, et al., 2006) και οι Alpár et al (Alpár, et al., 2008) εξέτασαν διάφορες μεταλλάξεις του γονιδίου των βαρέων αλυσίδων της ανοσοσφαιρίνης σε ολόκληρα ιστικά δείγματα ασθενών με Β κυτταρικής αρχής μη-Hodgkin λεμφώματα. Παρά το γεγονός ότι εφαρμόστηκαν διαφορετικές μέθοδοι δειγματοληψίας (tile vs. grid sampling), και οι δύο ομάδες μπόρεσαν να διακρίνουν τα θετικά από τα μη νεοπλασματικά δείγματα. Στην εικόνα 19 φαίνεται μία φυσιολογική απεικόνιση υγιούς λεμφαδένα (από δύο κόκκινα και πράσινα σήματα) μία απεικόνιση λεμφαδένα με λέμφωμα μανδύα (ένα φυσιολογικό ζευγάρι και ένα με σύντηξη γονιδίων λόγω αμοιβαίας μετατόπισης  $t(11;14)(q13;q32)$ ) και μία απεικόνιση λεμφώματος Burkitt (πάλι ένα φυσιολογικό ζευγάρι και ένα αποτέλεσμα σύντηξης  $t(8;14)(q24;q32)$ ).

Αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες έχουν επίσης αναλυθεί σε διαταραχές του αιμοποιητικού ιστού. Οι Blandin et al. (Blandin, et al., 2008) μελέτησαν πολυσωμίες των χρωμοσωμάτων 4, 6, 10 και 17 για την οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία με υπερπλοειδικό καρυότυπο με τη χρήση τετραχρωμικού FISH. Ο μεγάλος αριθμός των πυρήνων που σημάνθηκαν αποκάλυψε ένα υψηλό επίπεδο μεταβλητότητας των χρωμοσωμάτων τόσο στη διάγνωση και στην υποτροπή, η οποία μπορεί να έχει προγνωστική σημασία και τεράστια επίδραση στις μελλοντικές θεραπευτικές στρατηγικές. Στην εικόνα 20 παρατηρούμε παραδείγματα πολυπλοειδίας από λεμφοβλάστες της συγκεκριμένης μελέτης.

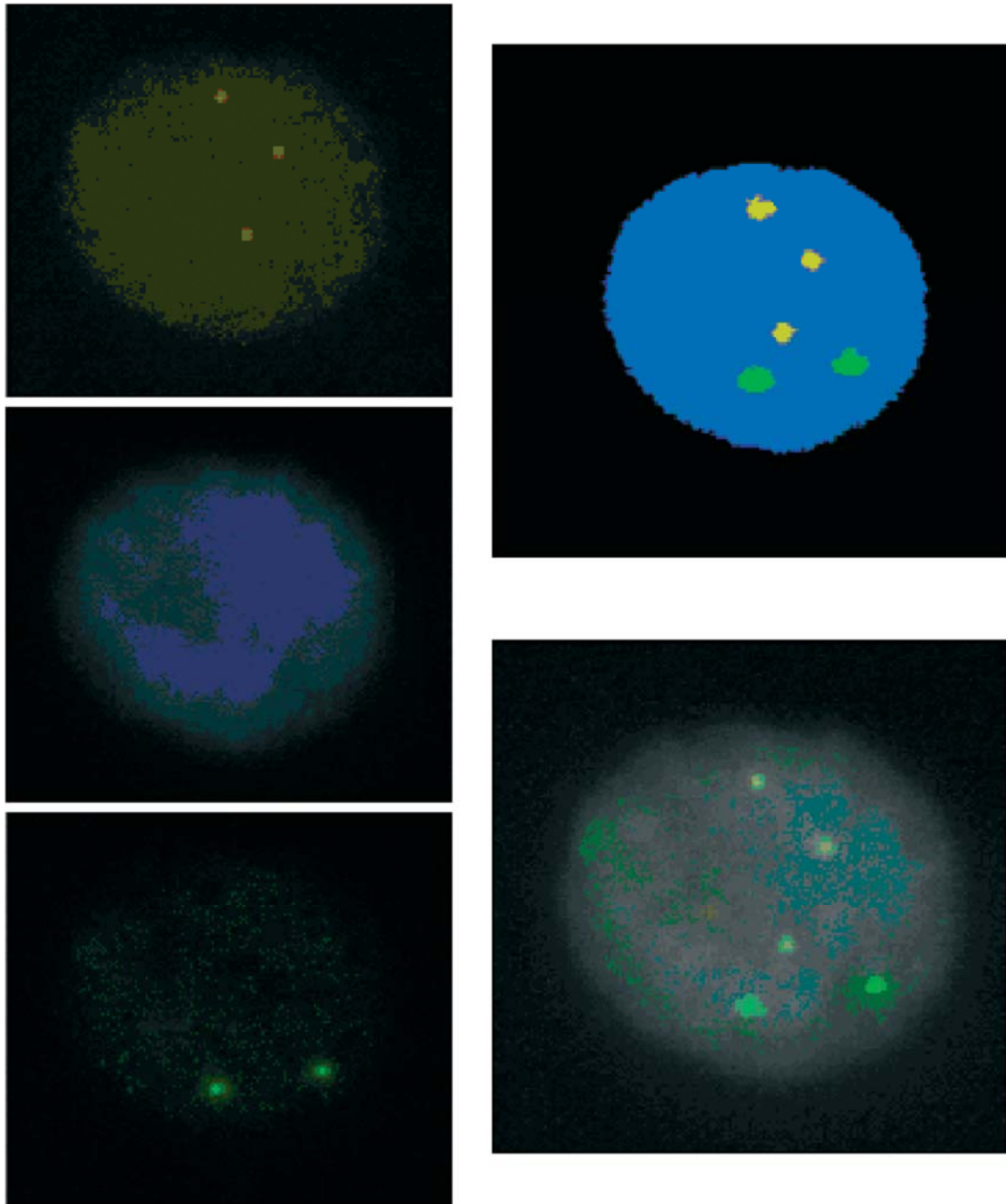


Εικόνα 20: Παράδειγμα πολυπλοειδίας σε λεμφοβλάστες

Η αυτόματη ανάλυση είναι πολύ χρήσιμη επίσης και σε μη-ογκολογικές περιπτώσεις επειδή τα δείγματα μπορεί να έχουν πολύ μικρότερη πυκνότητα κυττάρων (π.χ., διερεύνηση αμνιακού υγρού) από ότι στην περίπτωση των καρκινικών δειγμάτων ή όταν απαιτείται ανάλυση μεγάλου αριθμού κυττάρων (π.χ. διερεύνηση των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων). Αυτές οι συνθήκες κάνουν τη μη-αυτόματη ανάλυση εξαιρετικά χρονοβόρα και κουραστική. Η πρώτη μελέτη για την ανίχνευση με αυτόματη μέθοδο ανευσωμίας στο ανθρώπινο σπέρμα δημοσιεύθηκε από τους Baumgartner et al. (Baumgartner, et al., 2001). Κύτταρα σπέρματος σε επιχρίσματα σημάνθηκαν με ανιχνευτές LSI13 και CEPX και εξετάσθηκαν με δοκιμασμένο σύστημα καταφέροντας να μειώσουν τον χρόνο ανάλυσης από 8 ώρες/επίχρισμα σε 30 λεπτά/επίχρισμα. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το αυτόματο λέιζερ σύστημα σάρωσης είναι σε θέση να αντικαταστήσει τη μη-αυτόματη ανάλυση.

Μετάπειτα οι Perry et al. (Perry, et al., 2007), (Perry, et al., 2011) επέκτειναν αυτήν την εφαρμογή εισάγοντας ένα σύστημα που είναι σε θέση να χρησιμοποιεί τρία φλουοροχρώματα (CEPX, Y, και 18) ταυτόχρονα, προκειμένου να προσδιορίσει τη συχνότητα δισωμίας σε φυλετικά χρωμόσωμα και κατέληξαν στο ίδιο συμπέρασμα με την προηγούμενη μελέτη. Ομοίως οι Carrell et al. (Carrell & Emery, 2008), (Carrell, 2008) επίσης διερεύνησαν κύτταρα σπέρματος χρησιμοποιώντας ανιχνευτές για πέντε χρωμοσώματα (13, 18, 21, X, και Y) και βρήκαν, επίσης, ότι τα αυτόματα συστήματα μειώνουν αισθητά το χρόνο ανάλυσης. Επιπλέον, υψηλού βαθμού αναπαραγωγισιμότητα έχει αποδειχθεί διερευνώντας δείγματα από ασθενείς με στειρότητα και τετραπλοειδίες.

Ανευσωμίες εντοπίστηκαν σε κύτταρα στο αμνιακό υγρό από διάφορες επιστημονικές ομάδες, επιτυγχάνοντας σημαντική πρόοδο στον προγεννητικό έλεγχο (Evans, et al., 2006), (Lerner, et al., 2001), (Lev, et al., 2005), (Truong, et al., 2003), (Wauters, et al., 2007). Στην εικόνα 21 βλέπουμε αυτόματη ανίχνευση τρισωμίας 21 (τρία κίτρινα σημεία) με φυσιολογικό χρωμόσωμα 18 (δύο πράσινα σημεία) σε δείγμα αμνιακού υγρού.

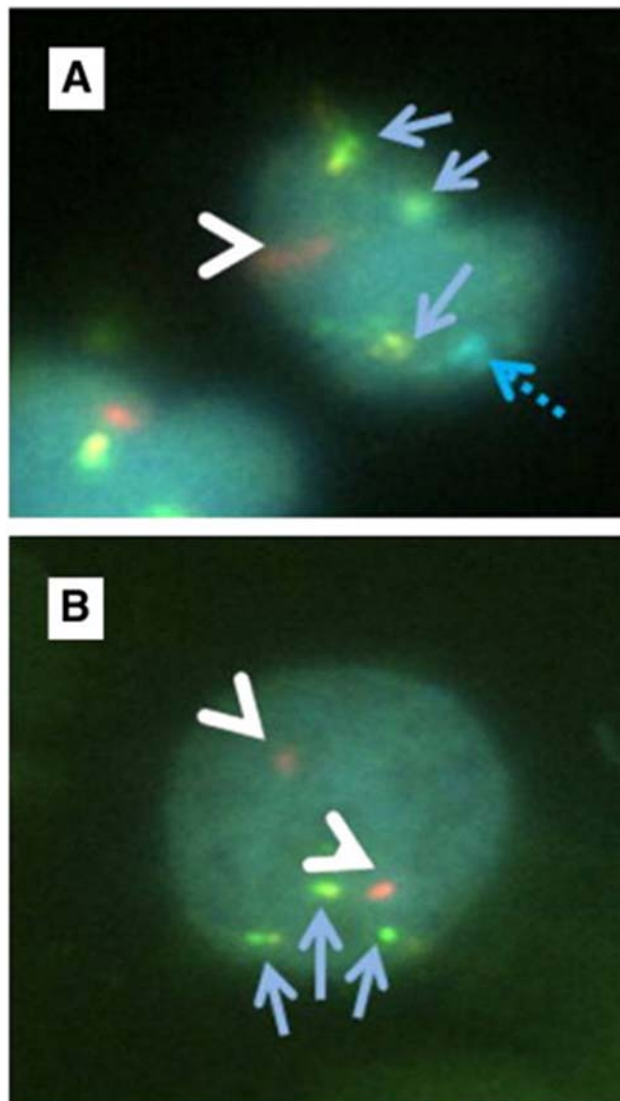


Εικόνα 21: Εξέταση αμνιακού υγρού για τρισωμία 21 (Down syndrome)

Αυτόματη FISH ανάλυση έχει εφαρμοστεί επίσης σε μη επεμβατικές προσεγγίσεις του προγεννητικού ελέγχου, δηλαδή, την ανάλυση των εμβρυϊκών κυττάρων που προέρχονται από τον τράχηλο της μήτρας (Sifakis, et al., 2010) ή που συλλέγονται από το μητρικό αίμα (Johnson, et al., 2007), (Kilpatrick, et al., 2004). Για να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης των εμβρυϊκών κυττάρων που σπάνια ανευρίσκονται στο μητρικό αίμα, οι Seppo et al. (Seppo, et al., 2008) και Oosterwijk et al. (Oosterwijk, et al., 1998) εισήγαγαν μία

ανοσοφαινοτυπική μέθοδο στηριζόμενη στη χρώση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης.

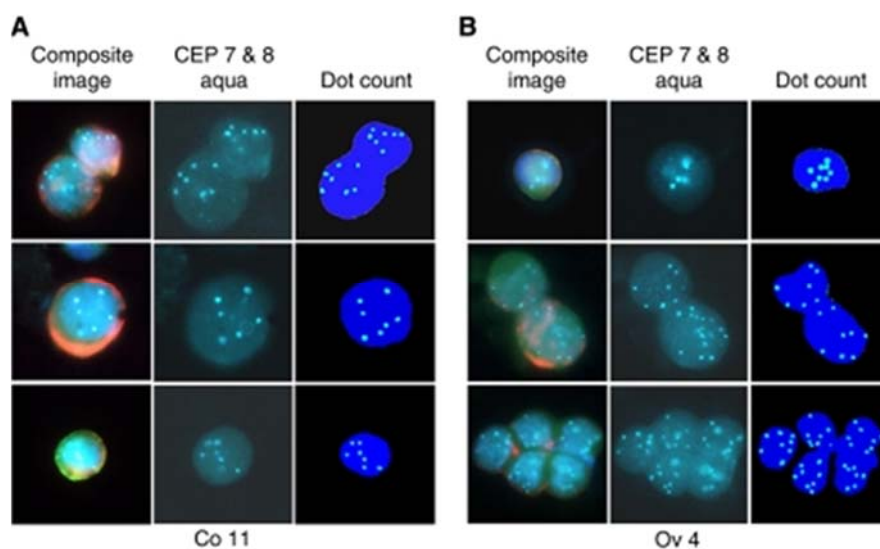
Στην εικόνα 22 παρατηρούμε δύο περιπτώσεις τρισωμίας 21 (συνδρόμου Down) σε δείγματα τροφοβλάστη από τράχηλο μήτρας της εγκύου. Στην εικόνα A βλέπουμε ένα πάσχον αγοράκι με ένα X χρωμόσωμα (άσπρο βέλος), ένα Y χρωμόσωμα (μπλε διακεκομμένο βέλος) και τρία χρωμοσώματα 21 (μπλε βέλος). Στην εικόνα B βλέπουμε ένα αντίστοιχο κοριτσάκι (δύο X χρωμοσώματα).



Εικόνα 22: Ταυτοποίηση κυττάρων με τρισωμία 21 σε δείγματα τραχήλου της μήτρας

Σε γενικές γραμμές, στοχευμένο FISH βάσει μορφολογίας (Bielorai, et al., 2002), (Guber, et al., 2010) και/ή ο ανοσοφαινότυπος (Alpár, et al., 2007), (Gaiser, et al.,

2011), (Méhés, et al., 2003), (Ntouroupi, et al., 2008), (Pajor, et al., 2008), πρέπει να είναι η μέθοδος εκλογής σε όλες τις περιπτώσεις όπου ο αριθμός των κυττάρων που εξετάζονται είναι πολύ χαμηλός, π.χ., ανίχνευση της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου (Alpár, et al., 2007), (Bielorai, et al., 2002), (László, et al., 2010), ανίχνευση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (Méhés, et al., 2003), (Ntouroupi, et al., 2008), και χμαιορισμό μετά από μεταμόσχευση αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων, ή όταν ο διαχωρισμός με οποιαδήποτε άλλη μέθοδο είναι δύσκολος (Gaiser, et al., 2011), (Guber, et al., 2010), (Pajor, et al., 2008), (Shimoni, et al., 2002).

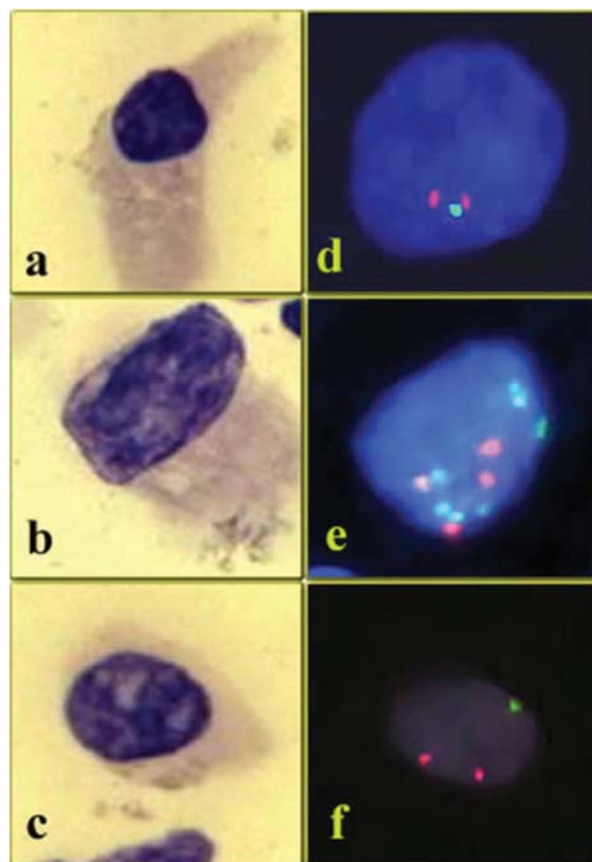


Εικόνα 23: Ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων από δείγματα αίματος ασθενών και καρκίνο εντέρου και ωοθηκών

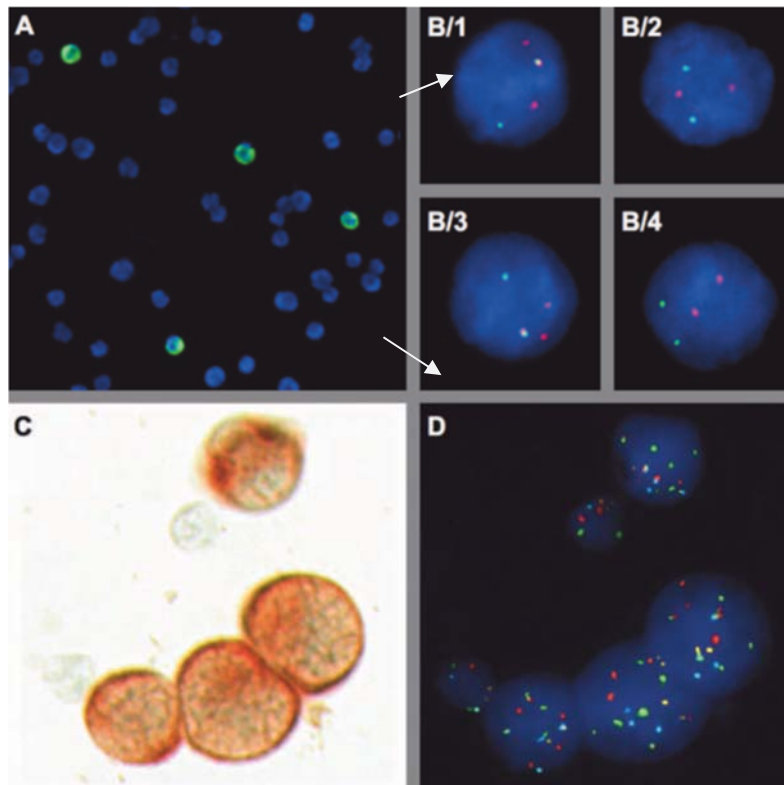
Στην εικόνα 23 βλέπουμε την εντόπιση καρκινικών πολυπλοειδικών κυττάρων σε περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο εντέρου (εικόνα A) και καρκίνο ωοθηκών (εικόνα B).

Στην εικόνα 24 φαίνονται σε σύγκριση κύτταρα από πύελα ασθενών και η αντίστοιχη ανάλυση FISH. Στο τμήμα (a) φαίνεται ένα μορφολογικά φυσιολογικό κύτταρο που όμως στην ανάλυση (d) φαίνεται ότι του ελλείπει το χρωμόσωμα 3. Στα λοιπά τμήματα η μορφολογία συνδυάζεται με παθολογικά σήματα FISH, πολυπλοειδίας ή έλλειψης.

Στην εικόνα 25 φαίνεται παράδειγμα συνδυασμένης ανάλυσης ανοσοφαινότυπου και FISH. Στο τμήμα A φαίνονται λεμφοβλαστικά κύτταρα θετικά στο CD10, από αυτά όμως με την εφαρμογή FISH μόνο τα δύο έχουν τη μετάθεση ETV6/RUNX1 (βέλη, B/1, B/3). Αντιθέτως στα τμήματα B/2 και B/4 παρατηρούμε κύτταρα που είναι ανοσοφαινοτυπικά θετικά στο CD10, δηλαδή είναι βλαστικά αλλά δεν περιέχουν την υπό εξέταση μετάλλαξη. Στα τμήματα C και D φαίνονται καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστεως τόσο με χρώση ανοσοφαινότυπου όσο και οι αριθμητικές διαταραχές τους με πολυχρωματικό FISH.



Εικόνα 24: Συσχέτιση μορφολογίας με FISH ανάλυση

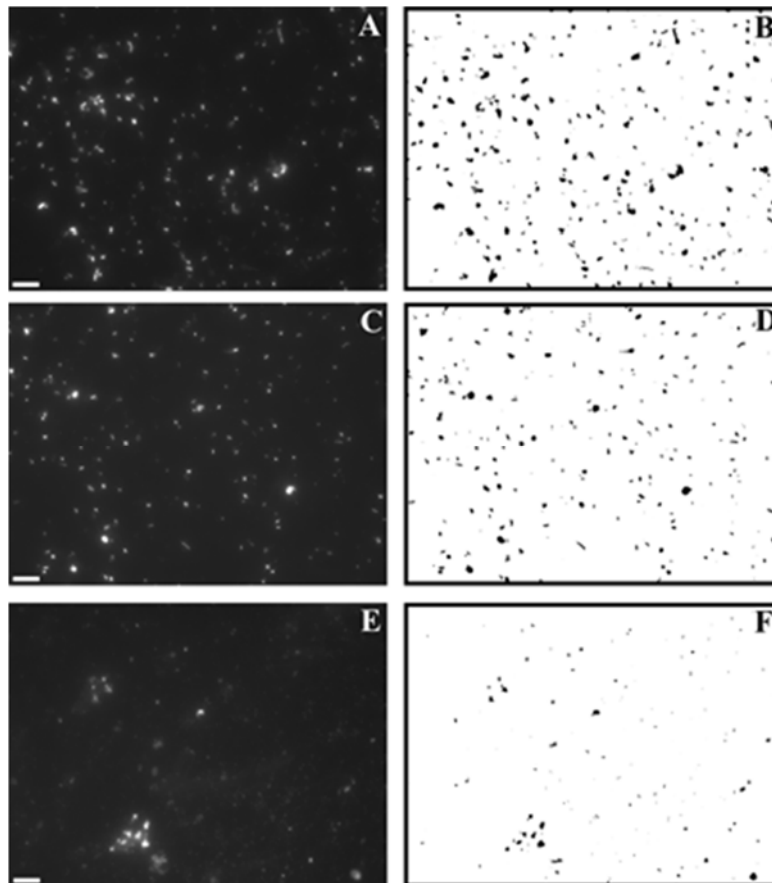


Εικόνα 25: Συνδυασμός ανοσοφαινότυπου με FISH

Για τον εντοπισμό σπάνιων γεγονότων, π.χ., ελάχιστη υπολειπόμενη νόσο σε ασθενείς υπό θεραπεία κατά του καρκίνου, διάφορες τεχνικές που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και στην κυτταρομετρία ροής είναι οι πλέον προτιμώμενες μέθοδοι. Ωστόσο, οι τεχνικές μοριακής γενετικής δεν είναι μέθοδοι βασισμένες στο κύτταρο και επομένως παρέχουν μόνο έμμεση εκτίμηση σχετικά με το πραγματικό φορτίο του όγκου. Επιπλέον, παθολογικός φαινότυπος διαφορετικός από αυτόν των φυσιολογικών κυττάρων δεν είναι πάντα παρών, ή μπορεί να χαθεί κατά την κλωνική εξέλιξη δυσκολεύοντας την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής. Αυτά τα θέματα αποδεικνύουν την καταλληλότητα των μεθόδων που βασίζονται στο κύτταρο στη συνδυασμένη συλλογή μορφολογικών, φαινοτυπικών και γονοτυπικών χαρακτηριστικών γνωρισμάτων σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου. Μείζονος σημασίας είναι επίσης κάποιες ειδικές εφαρμογές της αυτόματης ανάλυσης συμπεριλαμβανομένης της ποσοτικοποίησης του μήκους των τελομερών αποκαλύπτοντας την ανώμαλη τους δομή (Canela, et al., 2007), (Klewes, et al., 2011), (Narath, et al., 2004) και του ελέγχου της ακριβούς θέσης κάποιων

χρωμοσωμικής περιοχής (Kozubek, et al., 2001). Οι εξετάσεις αυτές δεν είναι εντούτοις ακόμα μέρος της κλινικής πρακτικής, στην πραγματικότητα όμως αποδεικνύουν τη σημασία και τη "βιωσιμότητα" της αυτόματης FISH ανάλυσης.

Σε ένα διαφορετικό αλλά επίσης ενδιαφέρον πεδίο επιστημών, αυτό της περιβαλλοντικής μικροβιολογίας, η αυτόματη ανάλυση εικόνων FISH βοηθάει στην άμεση ανίχνευση κυττάρων από περιβαλλοντικά υλικά όπως χώμα, χημικά και φυσικά λιπάσματα με απώτερο σκοπό τον εντοπισμό μικροβίων (Bennke, et al., 2016), (Zhou, et al., 2007) (εικόνα 26).



Εικόνα 26: Αποτελεσματική αυτόματη αναγνώριση κυττάρων σε δείγμα χώματος

## 4.3 Αυτόματα συστήματα ανάλυσης εικόνων FISH

Αναζητώντας συστήματα αυτόματης ανάλυσης εικόνας FISH που να είναι διαθέσιμα στο εμπόριο, εύκολα διαπιστώνει κανείς ότι υπάρχει μία ποικιλία επιλογών που έχει ως επακόλουθο τον αυξημένο γόνιμο ανταγωνισμό. Κάθε εταιρεία προσπαθεί να παρουσιάσει κάτι καινούργιο προσθέτοντας νέες εφαρμογές και διατηρώντας ανταγωνιστικές τιμές.

Από το 1986 η εταιρία MetaSystems<sup>5</sup> ασχολείται με το σχεδιασμό και την κατασκευή συστημάτων για την ηλεκτρονική αυτόματη μικροσκοπική απεικόνιση. Από την αρχή, η στενή σχέση με τον τελικό χρήστη κατέχει ένα ουσιαστικό μέρος στη γενικότερη φιλοσοφία της εταιρείας. Τις επόμενες τρεις δεκαετίες έχουν αποκαλύψει ότι αυτό ήταν μια επιτυχημένη στρατηγική, από το ταπεινό ξεκίνημα, η MetaSystems έχει εξελιχθεί σε ένα κορυφαίο πάροχο λύσεων που εξακολουθούν να παραμένουν συνδεδεμένες με τις ισχυρές ρίζες. Η τελευταία καινοτομία της MetaSystems, το Neon, είναι μια δυναμική, σύγχρονη πλατφόρμα απεικόνισης η οποία διαχειρίζεται αξιόπιστα περιπτώσεις εικόνων, και αποτελεσμάτων από μεμονωμένα περιβάλλοντα σταθμών εργασίας μέχρι μεγάλες εγκαταστάσεις πολλών χρηστών, ή/και πολλαπλών τοποθεσιών. Η Neon πλατφόρμα απεικόνισης διασφαλίζει επιπλέον ότι όλες οι σχετικές πληροφορίες είναι προσβάσιμες όποτε χρειάζεται. Τα μέρη που την αποτελούν είναι το Metafer που αυτοματοποιεί αξιόπιστα ένα μεγάλο τμήμα της ανάλυσης μιας εικόνας μικροσκοπίου στις επιστήμες Υγείας, ο Ikaros που είναι ένα καρυοτυπικό σύστημα σχεδιασμένο για το Neon που συνδυάζει ευκολονόητα γραφικά με ισχυρά εργαλεία στην οθόνη για μεγαλύτερη ευελιξία και η Isis αποτελεί μία επαγγελματική μονάδα φθορίζουσας απεικόνισης (MetaSystems, 2017). Οι Reichard et al. (Reichard, et al., 2006) χρησιμοποίησαν αυτό το αυτόματο σύστημα για την ανίχνευση συγκεκριμένων μεταλλάξεων σε λεμφαδενικό ιστό ασθενών με λέμφωμα Β κυτταρικής αρχής (εικόνα 19). Η σύγκριση με τη συμβατική καρυοτυπική μέθοδο έδειξε 100% σύμπτωση αποτελεσμάτων (πίνακας 1).

---

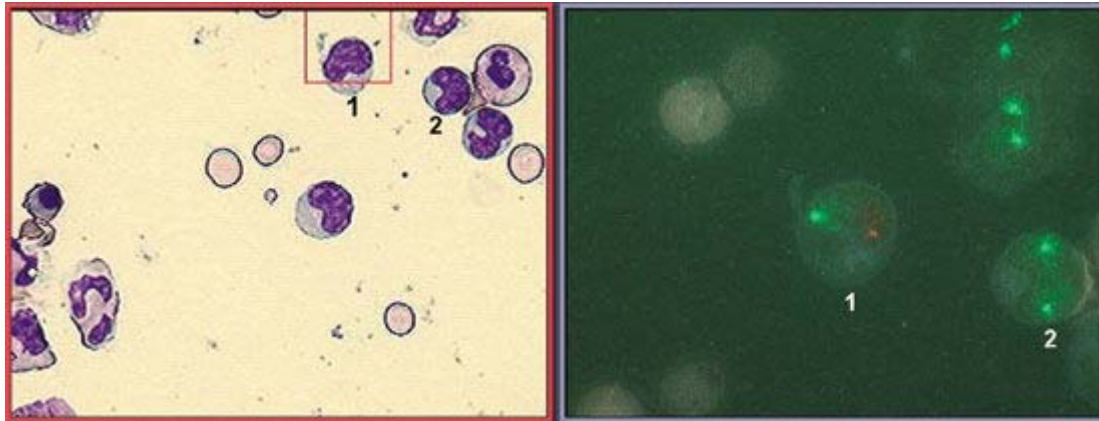
<sup>5</sup> <https://metasystems-international.com/>

Τύπος	Περιστατικά	Επιτυχείς Υβριδοποιήσεις	Περιστατικά με σύντηξη	Συσχέτιση με συμβατικό καρυότυπο
Λέμφωμα Burkitt	11	9	9	9/9(100%)
Λέμφωμα μανδύα	7	7	7	7/7(100%)
Οζώδες Λέμφωμα	13	11	10	2/2(100%)

Πίνακας 1: Συσχέτιση αυτόματης μεθόδου Metafer με συμβατική μέθοδο

Η πλατφόρμα BioView Duet<sup>6</sup> αυτόματης ανάλυσης εικόνων έχει σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο ώστε να διευκολύνει απρόσκοπτα την ανάλυση και την αναφορά των διαδικασιών. Ταυτόχρονα μειώνει το χρόνο που σπαταλείται σε δοκιμαστικές εργασίες εξετάσεων εργαστηρίων κυτταρογενετικής, παθολογίας και κυτταρολογίας. Η εταιρεία έχει ευρύ χαρτοφυλάκιο αυτόματων πλατφόρμων που εξασφαλίζει σωστή εφαρμογή για τις ανάγκες του εργαστηρίου, παρέχοντας λύσεις για διαφορετικούς όγκους δείγματος και ικανοποιώντας τις απαιτήσεις διαφορετικών επιπέδων αυτοματισμού (BioView, 2014). Οι Shimoni et al (Shimoni, et al., 2002) χρησιμοποίησαν το προαναφερθέν σύστημα για τον καθορισμό χιμαιρισμού σε περιφερικό αίμα άρρενος ασθενή που υποβλήθηκε σε μεταμόσχευση από θήλυ δότρια μυελού των οστών. Στην εικόνα 27 βλέπουμε αριστερά άμεση μικροσκόπηση και εντοπισμό κυττάρων (λεμφοκυττάρων). Στην δεξιά εικόνα φαίνεται ότι ένα από τα εμφανιζόμενα κύτταρα έχει φαινότυπο άρρενος XY (ένα πράσινο και ένα κόκκινο σήμα), ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα έχουν φαινότυπο XX (δύο πράσινα σήματα). Οι Smith et al συγκρίνοντας τη συγκεκριμένη μέθοδο με τη συμβατική κυτταρογενετική μη-αυτόματη καταλήγει σε ποσοστό συμφωνίας 94% (πίνακας 2) (Smith & Bentz, 2010).

<sup>6</sup> <http://bioview.com/>



Εικόνα 27: Χρήση συστήματος BioView σε δοκιμασία χιμαιρισμού

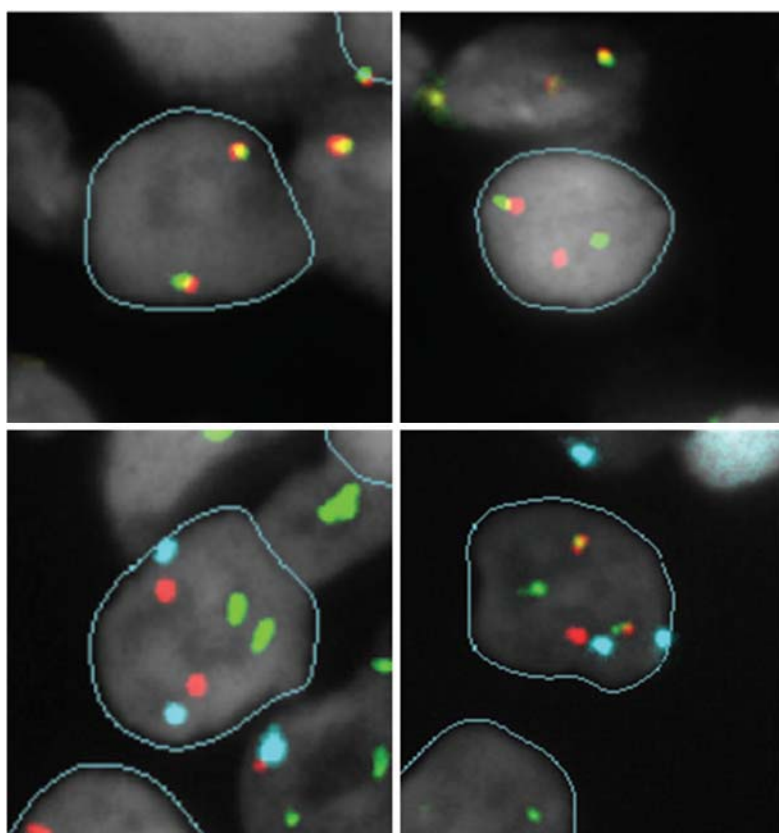
		Manual Interpretation	
	Negative	Positive	Total
Duet-Assisted Interpretation			
Negative	58	1	59
Positive	4	18	22
Total	62	19	81

Πίνακας 2: Συγκριτικά αποτελέσματα κατά Smith et al (Smith & Bentz, 2010)

Η Applied Spectral Imaging, Inc. (ASI)<sup>7</sup> έχει μπει πολύ δυναμικά στο πεδίο της αυτόματης ανάλυσης. Το GenASIs FISH είναι ένα ισχυρό εργαλείο για τους FISH τεχνολόγους που εργάζονται σε παθολογικά και κυτταρογενετικά εργαστήρια. Με το GenASIs FISH, τα εργαστήρια μπορούν να εργάζονται γρηγορότερα και να παρέχουν πιο ακριβή αποτελέσματα χρησιμοποιώντας καινοτόμα εργαλεία και ιδανική ροή εργασίας. Η εφαρμογή GenASIs SpotScan αναλύει αυτόματα FISH κύτταρα. Ενώ η FISHView εκτελεί ανάλυση σε ένα κύτταρο κάθε στιγμή, το SpotScan αναλύει όλα τα κύτταρα σε όλα τα οπτικά πεδία. Μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα, το SpotScan είναι σε θέση να παρέχει στατιστική ανάλυση όλων των κυττάρων που υπολογίζονται, να δείχνει τον αριθμό των σημάτων και άλλα κλινικά δεδομένα καθώς τα ταξινομεί σε κατηγορίες. (Imaging, 2017). Οι Liew et

<sup>7</sup> <http://www.spectral-imaging.com/>

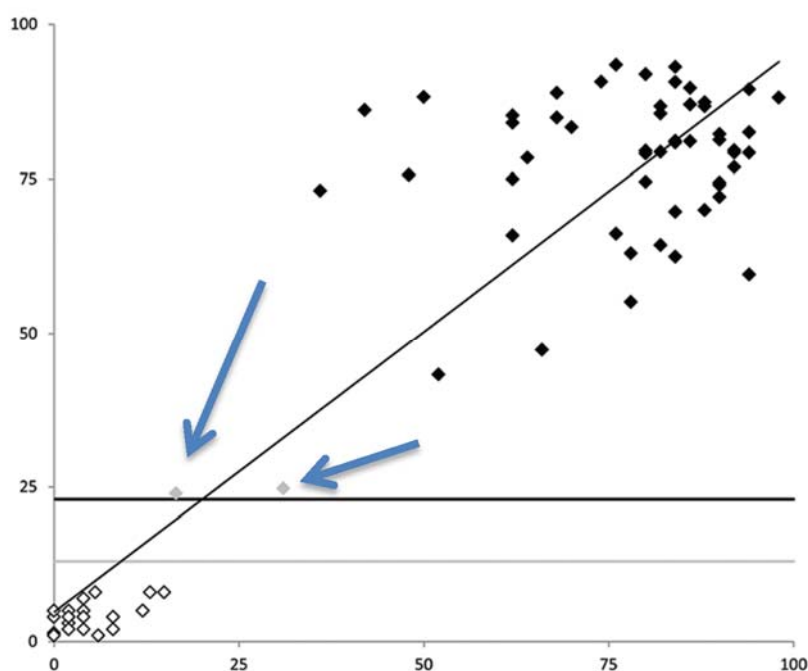
al (Liew, et al., 2016) πρόσφατα δοκίμασαν το σύστημα GenASIs στην ανίχνευση συγκεκριμένων μεταλλάξεων σε ασθενείς με Β-λέμφωμα. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος είναι γρήγορη, έγκυρη και αξιόπιστη. Στην εικόνα 28 παρατηρούμε στην αριστερή στήλη δύο φυσιολογικά κύτταρα, και στη δεξιά δύο κύτταρα με μεταλλάξεις διαχωρισμού στην πάνω δεξιά εικόνα (διαχωρισμός πράσινου με κόκκινου σήματος ενώ έπρεπε να ήταν ενωμένα) και σύντηξης στην κάτω δεξιά εικόνα (ένωση πράσινου και κόκκινου σήματος ενώ έπρεπε να ήταν ξεχωριστά).



Εικόνα 28: Εφαρμογή συστήματος GenASIs

Όσον αφορά τη σύγκριση της υπό εξέτασης μεθόδου με τη μη-αυτόματη παρατηρήθηκε πολύ καλή συσχέτιση ( $R^2 = 0.85$ ). Συγκεκριμένα στο διάγραμμα 3 βλέπουμε την συσχέτιση μεταξύ αποτελεσμάτων με GenASIs (κάθετος άξονας και με μη-αυτόματη μέθοδο (οριζόντιος άξονας). Η έντονη μαύρη οριζόντια γραμμή αντιπροσωπεύει το θετικό όριο cut-off και η γκρι οριζόντια γραμμή το

αρνητικό cut-off. Αντίστοιχα τα μαύρα σημεία αντιστοιχούν σε θετικά δείγματα και τα άσπρα σε αρνητικά. Πλην δύο δειγμάτων που θεωρούνται οριακά και αμφισβητούμενα (γκρι σημεία-βέλη) για όλα τα υπόλοιπα δεν υπήρχε αναντιστοιχία αποτελεσμάτων.



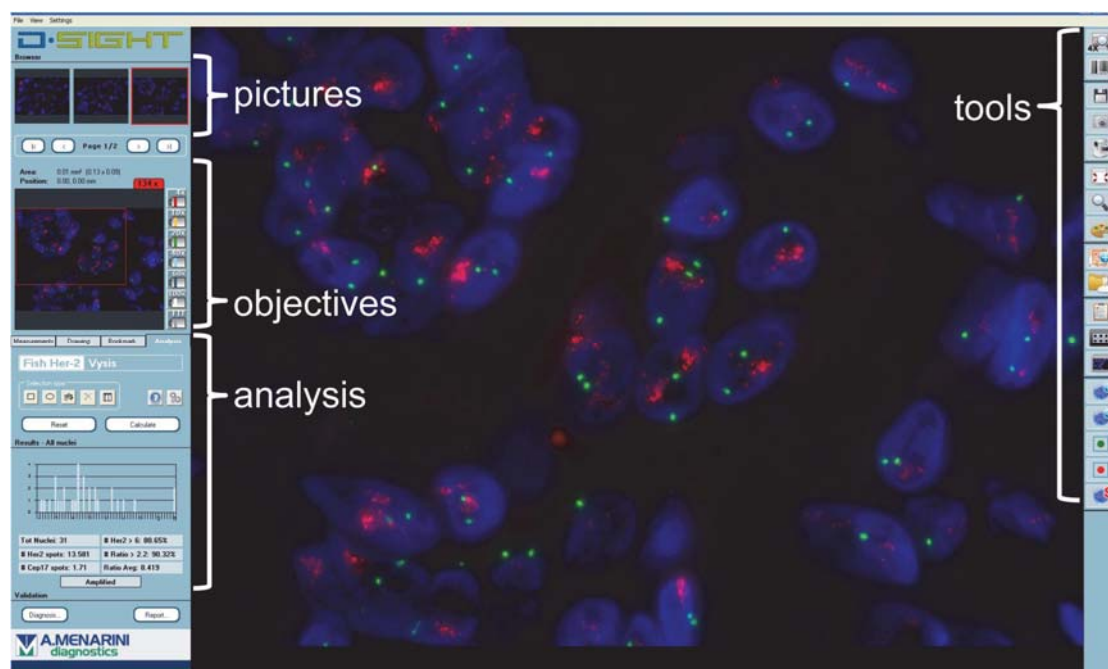
Διάγραμμα 3: Συσχέτιση αποτελεσμάτων συστήματος GenASIs (κάθετος άξονας) με μη-αυτόματη μέθοδο (οριζόντιος άξονας)

Η VISIA Imaging παρουσιάζει το σύστημα XCytoGen<sup>8</sup> που είναι μια πλατφόρμα καρυότυπου, με εύκολα στη χρήση γραφικά, και μια ποικιλία από ισχυρά εργαλεία που παρέχουν μέγιστη ευελιξία στην καθημερινή ρουτίνα της εργασίας. Το XCytoGen είναι ευέλικτο και χρησιμοποιείται από μία μονή λήψη εικόνας ως πλήρως αυτόματη ανάλυση επί οθόνης χωρίς χρήση μικροσκοπίου. Είναι συμβατό με μεγάλη γκάμα άλλων εργαλείων και εφαρμογών (Visia, 2014). Στην εικόνα 29 προβάλλεται το αποτέλεσμα εφαρμογής του αυτόματου συστήματος D-sight<sup>9</sup> της ίδιας εταιρείας σε δείγματα καρκίνου μαστού (van der Logt, et al., 2015). Το σύστημα επιλέγει αυτόματα τέσσερις περιοχές

<sup>8</sup> [http://www.visiainaging.com/cytogenetics\\_XCYTOGEN.php](http://www.visiainaging.com/cytogenetics_XCYTOGEN.php)

<sup>9</sup> [http://www.visiainaging.com/digital-pathology\\_DSIGHT-FISH.php](http://www.visiainaging.com/digital-pathology_DSIGHT-FISH.php)

ενδιαφέροντος (pictures). Εικόνες που έχουν παραχθεί από διαφορετικά πλάνα εστίασης συνδυάζονται δημιουργώντας μια εικόνα με όλα τα σήματα που είναι σαφώς ανιχνεύσιμα μετά την αφαίρεση του απροσδιόριστου θορύβου. Αυτοματοποιημένη επιλογή πυρήνα και μέτρηση σημείων χρώματος κόκκινου (HER2) και πράσινου (χρωμόσωμα 17 = CEP17) μπορεί να αξιολογηθεί και να διορθωθεί από τον κυτταρογενετιστή, εάν είναι απαραίτητο (objectives and tools). Υπό επίβλεψη αυτοματοποιημένη βαθμολόγηση γίνεται σε τουλάχιστον δύο εικόνες και δημιουργείται η αναλογία μεταξύ HER2 και CEP17 (analysis), η οποία καθορίζει τόσο την πρόγνωση του νοσήματος όσο και την απάντηση στη θεραπεία.

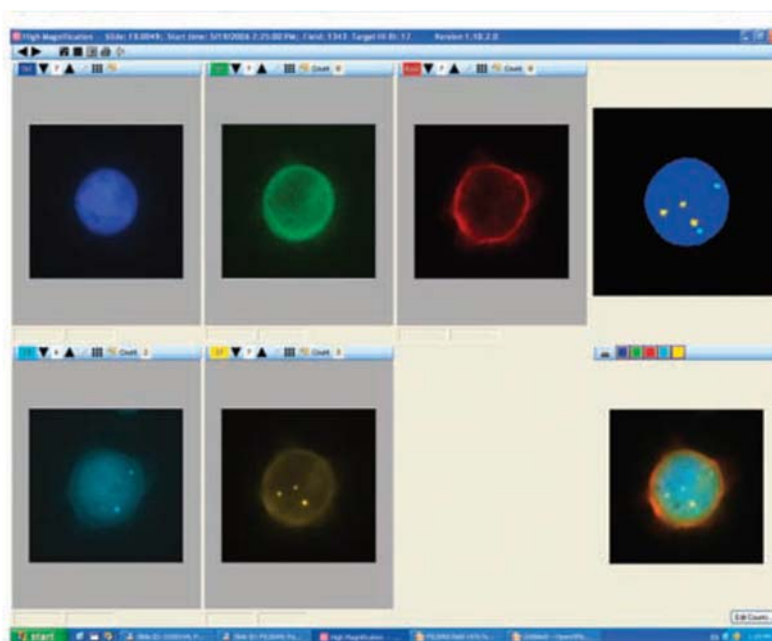


Εικόνα 29: Εφαρμογή συστήματος D-sight

Το σύστημα Ikoniscope Digital Microscopy System<sup>10</sup> της εταιρείας ikonys παρέχει πλήρως αυτοματοποιημένο χειρισμό δειγμάτων, πλήρη σάρωση και σύλληψη και ανάλυση σε πραγματικό χρόνο. Μόνο το Ikoniscope απαριθμεί και ταξινομεί κυτταρικούς πυρήνες χωρίς επιτήρηση ώστε οι τεχνολόγοι να εστιάζονται αποκλειστικά στην ταξινόμηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Ikonisys, 2017). Στην εικόνα 30 παρατηρούμε εφαρμογή του συγκεκριμένου

<sup>10</sup> <http://www.ikonisys.com/documents/IkonisysBrochures/IkoniscopeBrochure.pdf>

συστήματος σε μελέτη των Ntourouri et al (Ntourouri, et al., 2008) για ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών με διαγνωσθέν καρκίνο. Φαίνεται καθαρά η τρισωμία 17 (κίτρινα σημεία) και το χρωμόσωμα 18 (μπλε σημεία) που είναι φυσιολογικό.



Εικόνα 30: Εφαρμογή συστήματος iconoscope

Οι συγγραφείς καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η αυτόματη ανάλυση είναι άκρως απαραίτητη σε δείγματα με πολύ μικρή αναλογία του υπό εξέταση κυτταρικού πληθυσμού. Συγκεκριμένα, απέδειξαν ότι το σύστημα Ikonoscope, που βασίζεται σε αυτόματη φθορίζουσα μικροσκόπηση, μπορεί να ανιχνεύσει εύκολα λιγότερο από ένα επιθηλιακό κύτταρο που κυκλοφορεί σε ένα χιλιοστόλιτρο του αίματος.

Η Leica Biosystems έχει μία μεγάλη γκάμα επιλογών που βοηθά τη διαγνωστική προσέγγιση του καρκίνου, όπως η πλατφόρμα CytoVision<sup>11</sup> που έχει δοκιμαστεί πολλάκις από πολλές ερευνητικές μελέτες με πολύ καλά αποτελέσματα. Η συγκεκριμένη πλατφόρμα επεκτείνεται όσον αφορά την εφαρμογή της από

<sup>11</sup> <http://www.leicabiosystems.com/clinical-microscopy-surgery-radiology/cytogenetics/products/cytovision/>

αυτοδύναμους σταθμούς για καρυτότυπο και FISH, ως πλήρως αυτόματη αποθήκευση μέχρι 120 διαφανειών κυτταρικών εικόνων FISH (Biosystems, 2017).

Το σύστημα TissueFAXS-plus της TissueGnostics<sup>12</sup> έχει επίσης μπει δυναμικά στο χώρο της αυτόματης ανάλυσης και επεξεργασίας εικόνας FISH. Πρόσφατα οι Radziuviene et al (Radziuviene, et al., 2017) δημοσίευσαν αποτελέσματα χρήσης του συστήματος για τον ορισμό της γενετικής ετερογένειας σε ασθενείς με καρκίνο μαστού. Οι συγγραφείς οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι η χρήση του συγκεκριμένου αυτόματου συστήματος επιτρέπει εξαγωγή γραμμικών ανεξάρτητων βαθμολογιών της ενίσχυσης, πολυσωμίας, και συνδυαστικότητας με μεταγενέστερες διαστρωμάτωσεις σε σχετικά μονοδιάστατους και πιο πολύπλοκους όγκους.

---

<sup>12</sup> <http://www.tissuegnostics.com/en/products/systems/tissuefaxs-plus>

# Κεφάλαιο 5

## Συζήτηση

---

Ο *in situ* υβριδισμός, αναπτύχθηκε στα τέλη δεκαετίας του '60 μέχρι στις αρχές της δεκαετίας του 70, και η σήμανση με φθορισμό εμφανίστηκε μια δεκαετία αργότερα. Εξαιτίας της ολοένα αυξανόμενης αποτελεσματικότητας των ανιχνευτών σήμανσης, η δημοτικότητα του FISH γρήγορα άρχισε να αυξάνεται στις αρχές της δεκαετίας του 90. Δεν ήταν πολύ προηγουμένως που οι κυτταρογενετιστές συνειδητοποίησαν, ότι η αξιολόγηση ακόμη και ο χειρισμός των δεδομένων χρειάζονται πολύ κόπο, και απαιτούν τεχνογνωσία και υψηλή αντοχή, ιδιαίτερα, σε περιπτώσεις ανάλυσης μεγάλου αριθμού πυρήνων κυττάρων. Ως εκ τούτου, δεν αποτέλεσε καμία έκπληξη το γεγονός ότι οι εμπειρογνώμονες σχεδόν αμέσως άρχισαν να εξετάζουν διάφορες δυνατότητες για να αυτοματοποιήσουν τη διαδικασία.

Έχουν γίνει διάφορες επιτυχημένες προσπάθειες, και με εξαίρεση κάποιες πρώτες τεχνικές μελέτες οι δύο πρωταρχικοί στόχοι ήταν πάντα:

- (i) να φθάσει ή και να υπερβεί ακόμα την ακρίβεια αξιολόγησης των εμπειρογνομόνων, και
- (ii) να δημιουργήσει ένα γρήγορο και αποτελεσματικό μέσο, που απαιτεί όσο το δυνατόν ελάχιστη επίβλεψη (Pajor, et al., 2012a).

Όσον αφορά τον πρώτο στόχο, ακόμα κι αν έχουν δημιουργηθεί συστήματα υψηλής ακρίβειας με βάση την σχετική βιβλιογραφία, είναι φανερό ότι το επίπεδο αυτού του χαρακτηριστικού γνωρίσματος, θα πάει ακόμα πιο ψηλά πλησιάζοντας περισσότερο την ανθρώπινη ερμηνεία. Ο λόγος για αυτό είναι ότι η αξιολόγηση του FISH σήματος απαιτεί δυνατότητες ακριβούς αναγνώρισης και ερμηνείας της παραγόμενης εικόνας. Τα συστήματα που έχουν ήδη αναπτυχθεί πλησιάζουν την ανθρώπινη ερμηνεία με πολύ καλά αποτελέσματα. Οι μελέτες αξιολόγησης συστημάτων αυτόματης ανάλυσης εικόνων FISH και

σύγκρισης με τη μη-αυτόματη μέθοδο, που παρατέθηκαν στο αντίστοιχο κεφάλαιο, απέδειξαν απόλυτη συμφωνία σε αρκετές περιπτώσεις.

Τα FISH σήματα δεν είναι ομοιόμορφα, ενώ οι τύποι των ανιχνευτών, οι περιοχές στόχοι, η επιλογή του φλουοροχρώματος, το είδος του δείγματος και ο χειρισμός του αποτελούν παράγοντες που επηρεάζουν τη μορφολογική μεταβλητότητα του σήματος και μπορεί να οδηγήσουν σε διάφορα είδη θορύβου που μιμούνται το σήμα που θα μπορούσε να διαταράξει την ερμηνεία της παραγόμενης εικόνας (Pajor, et al., 2012a). Οι ποικίλοι και πολύπλοκοι ορισμοί των δοκιμασιών των θετικών κυττάρων, μαζί με τα άτυπα και ανώμαλα σήματα κάνουν ακόμη πιο δύσκολη την ερμηνεία τους. Για αυτό ίσως στα περισσότερα άρθρα είναι πολύ δύσκολο να κατανοήσει κανείς αν η μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι αυτόματη ή ημι-αυτόματη, μπερδεύοντας ακόμα και τις ίδιες τις έννοιες. Δεδομένου ότι οι ορισμοί είναι κοινοί τόσο για τη μη-αυτόματη όσο και για την αυτόματη ανάλυση, οι προαναφερθείσες τακτικές ερμηνείας χρησιμοποιούνται επίσης για την εκπαίδευση συστημάτων αυτόματης ανάλυσης. Κατά συνέπεια τα ίδια προβλήματα, που αντιμετωπίζει ο εμπειρογνώμονας κατά τη διάρκεια της αξιολόγησης για επιτυχή αναγνώριση του βιολογικού φαινομένου, θα αντιμετωπίσει και το αυτόματο σύστημα οδηγώντας σε ίδιο ποσοστό σφαλμάτων.

Από την άλλη πλευρά, όσον αφορά τον δεύτερο προαναφερθέντα στόχο, η ανθρώπινη εργασία προφανώς δεν θα μπορούσε να ανταγωνιστεί με την ταχύτητα, τη συνέπεια και την αντοχή αυτών των συστημάτων. Στην περίπτωση της αυτόματης ανάλυσης η κόπωση και η ταχύτητα δεν αλλοιώνει τα αποτελέσματα και εφόσον οι συνθήκες προετοιμασίας δεν αλλάζουν δραματικά λαμβάνονται αποτελέσματα συνεπή και αντικειμενικά. Παρόλο που η επάνδρωση ενός σταθμού εργασίας με αυτόματο μικροσκόπιο είναι δαπανηρή (Carrell, 2008), η αυτόματη ανάλυση παρουσιάζει πλεονεκτήματα:

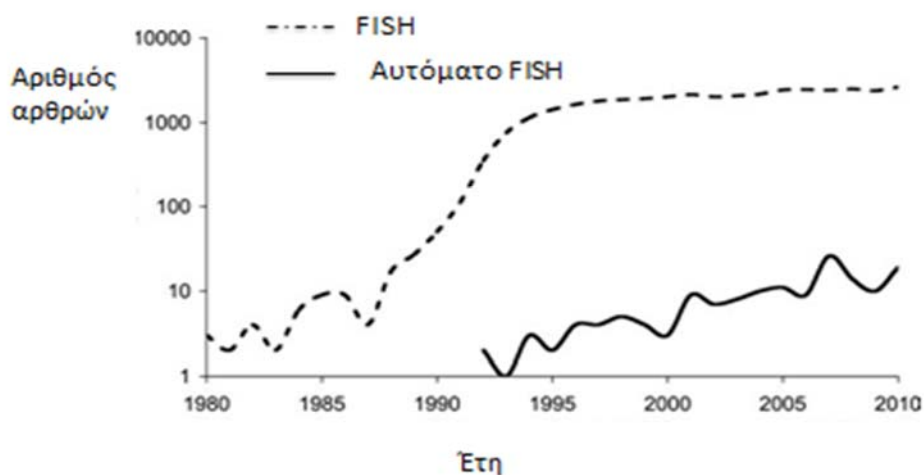
- η αυτόματη ανάλυση επιτρέπει την έρευνα μεγάλου αριθμού κυττάρων χωρίς αύξηση του απαιτούμενου χρόνου (Netten, et al., 1997),

- η αξιόπιστη ανίχνευση θετικών κυττάρων που παρουσιάζονται σε πολύ χαμηλό ποσοστό θα μπορούσε να γίνει διαθέσιμη μέσα από την εξέταση υψηλού αριθμού πυρήνων (Erlecke, et al., 2009),
- τα αντικειμενικά κριτήρια κάνουν την ανάλυση ανεξάρτητη από το ικανότητες και την μεροληψία του αξιολογητή (Kajtár, et al., 2006),
- η αυτοματοποίηση εξαλείφει την διερευνητική μεταβλητότητα και παράγει υψηλότερη στατιστική αξιοπιστία από ότι η μη-αυτόματη ανάλυση ακόμα κι αν εξετάζεται ο ίδιος αριθμός κυττάρων (Kajtár, et al., 2006),
- τα πεδία και οι διαφάνειες της ψηφιακής εικόνας επιτρέπουν την επανάληψη μορφομετρικών μετρήσεων χωρίς εξασθένιση των FISH σημάτων,
- το κάθε αντικείμενο μελέτης αποθηκεύεται στη συλλογή που δημιουργείται, παρέχοντας μια εξαιρετική τεκμηρίωση της ανάλυσης (Kajtár, et al., 2006),
- λόγω της σχετικής συλλογής των μορφομετρικών παραμέτρων τα χαρακτηριστικά των πυρήνων μπορούν να αναλυθούν σε οποιαδήποτε σειρά και συνδυασμό. Ως εκ τούτου, τα συστήματα αυτά δεν αναλύουν μόνο σήματα FISH, αλλά παρέχουν επίσης τη δυνατότητα για πολύπλοκες κυτταρομετρικές έρευνες,
- οι συντεταγμένες του κάθε αντικειμένου αποθηκεύονται επιτρέποντας τη γρήγορη και ακριβή επανατοποθέτηση, η οποία αποτελεί προϋπόθεση για τη συνεχή διερεύνηση της μορφολογίας, του φαινοτύπου και του γονοτύπου σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου (Alpár, et al., 2007),
- η αυτόματη ανάλυση διευκολύνει την αντικειμενική εκτίμηση των ιστολογικών δειγμάτων η οποία είναι συχνά δύσκολη, λόγω της παρουσίας ελλিপών, εφαπτόμενων, και επικαλυπτόμενων πυρήνων,
- είναι εφικτή η ανίχνευση βάσει των κυττάρων της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου, των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων και της κλωνικής εξέλιξης.

Με βάση τα παραπάνω είναι φανερό ότι η χρήση των αυτόματων συστημάτων επεξεργασίας και ανάλυσης FISH είναι πολύ σημαντική. Παρόλο αυτά με βάση τη

σχετική βιβλιογραφία οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι υπάρχει έλλειψη πειραματικών πρωτοκόλλων τα οποία θα οδηγούσαν σε αντικειμενικά και επαρκή αποτελέσματα. Συνήθως οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στην παρουσίαση των πειραμάτων και αποτελεσμάτων δεν είναι εναρμονισμένοι πλήρως με τη διεθνή ονοματολογία του επιστημονικού αντικειμένου. Η εναρμόνιση με τη διεθνή ονοματολογία θα οδηγήσει στην ανάπτυξη πρωτοκόλλου σχεδιασμού και υλοποίησης αυτόματων συστημάτων επεξεργασίας και ανάλυσης. Το πρωτόκολλο αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα:

- (i) την ομοιόμορφη περιγραφή των πειραμάτων, αποφεύγοντας την περιττή πληροφορία η οποία μπερδεύει τον αναγνώστη να κατανοήσει πλήρως τα συμπεράσματα και την ερμηνεία της εκάστοτε πειραματικής διάταξης, και
- (ii) την ανάπτυξη περισσότερων συστημάτων αυτόματης ανάλυσης η οποία διατηρείται ακόμη σε πολύ χαμηλά επίπεδα (διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 4: Αρθρογραφία από το 1980 ως σήμερα

Επιπλέον το πρωτόκολλο θα περιγράφει την αλληλουχία των διαδικασιών η οποία θα πρέπει να ακολουθείται για όλα τα πειράματα αυτόματης ανάλυσης FISH. Αυτό θα ήταν απαραίτητο για την διατήρηση της εμπιστοσύνης μεταξύ

επιστημόνων Πληροφορικής και Ιατρικής με αποτέλεσμα την επιτυχία και τη διάδοση της τεχνικής. Για τη δημιουργία του πρωτοκόλλου είναι απαραίτητη η συνέργεια των εμπλεκόμενων επιστημονικών πεδίων. Οι Rajor et al, διατύπωσαν κάποιες σκέψεις και προκαταρκτικές προτάσεις για την προτυποποίηση των αυτόματων συστημάτων, περιλαμβάνοντας τόσο τις βασικές προδιαγραφές (πίνακας 3) όσο και άλλες επιπρόσθετες χρήσιμες πληροφορίες (πίνακας 4). Σημαντικό πρόβλημα για την επίτευξη της τυποποίησης είναι οι διαφορές που παρουσιάζουν μεταξύ τους τα αυτόματα συστήματα (Rajor, et al., 2012a). Οι διαφορές αυτές είναι συνήθως μικρές, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις είναι εννοιολογικές, και επομένως πραγματικά σημαντικές.

Από την άποψη της διαδραστικότητας, γενικά, υπάρχουν δύο τύποι συστημάτων. Το ένα παρέχει μεγάλη ελευθερία στον ερευνητή, ενώ το άλλο που μπορεί να περιγραφεί ως “plug-n-play” σύστημα. Το πρώτο, το επονομαζόμενο σύστημα εκπαιδευσιμου χρήστη, απαιτείται από τον ερευνητή να προβεί σε ειδική εκπαίδευση για όλες τις συγκεκριμένες προκαθορισμένες ρυθμίσεις ξεχωριστά και σε τοπικό επίπεδο. Η διαδικασία είναι επίπονη και χαρακτηρίζεται από χαμηλή καμπύλη μάθησης. Τα συστήματα αυτά συνήθως απαιτούν ένα ειδικό άτομο μέσα στην ομάδα εργασίας, που θα κυριαρχεί και θα την καθοδηγεί. Ωστόσο, υπάρχουν επίσης οφέλη όταν η γενική σκέψη είναι καθόλα προσαρμοζόμενη στο χρήστη. Η ρυθμιστικότητα και η ευελιξία των συστημάτων αυτών επιτρέπει κλινικά πειράματα σε κάθε τύπο δείγματος. Επιπλέον, διάφορες μετρήσεις κυτταρομετρίας με βάση το επίχρισμα μπορούν να εκτελούνται κάνοντας αυτούς τους σταθμούς εργασίας εξαιρετικά ευπροσάρμοστες επιστημονικές πλατφόρμες. Από την άλλη, τα συστήματα που είναι “plug-n-play” λειτουργούν με βάση προκαθορισμένες συνθήκες και παραμέτρους, για συγκεκριμένες εργασίες, όπως, για την αξιολόγηση συγκεκριμένων δοκιμασιών. Τα συστήματα αυτά, επομένως, είναι σχετικά εύκολα στη χρήση και η καμπύλη μάθησης είναι ανοδική, και όσο η καμπύλη φτάνει στα ανώτατα όρια, τόσο επιτείνεται η ευελιξία του συγκεκριμένου συστήματος. Ο βαθμός στον οποίο ένας κατασκευαστής πρέπει να παρεμβαίνει

στον προκαθορισμό ενός συγκεκριμένου σταθμού εργασίας αποτελεί πρόβλημα και είναι θέμα συζήτησης μεταξύ εμπειρογνομώνων.

Ένα ιδανικό σύστημα πρέπει να επιτρέπει βασικές όσο και πολύπλοκες έρευνες κυτταρομετρίας και αυτό θα πρέπει να έχει επίσης προκαθορισμένους αλλά και ρυθμιζόμενους αλγόριθμους για συγκεκριμένες εργασίες. Η τελευταία αυτή πτυχή είναι πολύ σημαντική επειδή τα κατώφλια των διαγνωστικών τιμών πρέπει να καθορίζονται ανάλογα με τα δεδομένα εισόδου σε συνδυασμό με επικυρωμένα πειράματα ελέγχου. Επομένως, θα ήταν προτιμότερο το πρωτόκολλο να συμπεριλαμβάνει τη διαδικασία που θα πρέπει να ακολουθήσει κάποιος για τον καθορισμό διαφόρων παραμέτρων και διαγνωστικών κατωφλιών παρά τις τιμές τους.

	Βασικές Προδιαγραφές	Περιγραφή προδιαγραφών
1	Αρνητικά και θετικά δείγματα ελέγχου	προέλευση, τύπος κυττάρων ή ιστών, καταμέτρηση
2	Ανάλυση δειγμάτων	προέλευση, τύπος κυττάρων ή ιστών, καταμέτρηση
3	Τεχνική προετοιμασίας κυττάρων/ιστών	προετοιμασία επιχρισμάτων, μονιμοποίηση, προεπιλογή
4	FISH ανιχνευτές	Ακολουθία στόχευσης, φλουορόχρωμα, σύστημα αξιολόγησης μορφής σήματος
5	FISH διαδικασία σήμανσης	Προεπεξεργασία, αλλοίωση, υβριδισμός, πλύσιμο, αντιχρωστική
6	Εξοπλισμός	Μικροσκόπιο, σαρωτής, πηγή φωτός, φίλτρα, μεγέθυνση, ανιχνευτής, παράμετροι υπολογιστή
7	Λογισμικό	Όνομα, δομοστοιχεία, πηγή
8	Ανάκτηση εικόνας	2D ή 3D, καταμέτρηση των πλάνων εστίασης, Z-step τιμή, ανίχνευση καναλιών, ευκρίνεια
9	Επεξεργασία εικόνας	Αλγόριθμοι για διόρθωση φόντου, όξυνση, λείανση, κ.λπ. και ακριβής σειρά τους
10	Κατάτμηση πυρήνα	Δειγματοληψία: μεμονωμένο κύτταρο ή ιστός, εφαρμοσμένοι παράμετροι και οι τιμές τους, ευαισθησία, ειδικότητα
11	Αναγνώριση σήματος	Εφαρμοσμένοι παράμετροι και οι τιμές τους, ποσοστό αναγνώρισης σωστού σήματος, ακρίβεια ανάλυσης
12	Συλλογή χαρακτηριστικών για αξιολόγηση	όπως, περιοχή πυρήνα, εκκεντρικότητα, μέτρηση σήματος,

		αναλογία διαφορετικών μετρήσεων ή εντάσεων σήματος, μετρήσεις απόστασης σήματος
13	Αξιολόγηση μορφής σήματος	Κριτήρια διαγνωστικά και αποκλεισμού, ταξινόμηση διαφόρων προτύπων σήματος
14	Καταμέτρηση δεδομένων που αναλύθηκαν	Μέσος όρος ανά δείγμα, εύρος
15	Ταχύτητα	Καθαρή ταχύτητα: χρόνος που απαιτείται για την ανάλυση ενός κυττάρου Συνολική ταχύτητα: χρόνος ανάλυσης δείγματος
15	Στατιστική	Ευαισθησία, ειδικότητα και ακρίβεια της ανάλυσης, διαγνωστικές οριακές τιμές συμπεριλαμβανομένης της διαδικασίας προσδιορισμού τους
16	Σύγκριση με μη αυτόματη ανάλυση	Συσχέτιση/αντιστοιχία των αποτελεσμάτων
17	Επίπεδο αυτοματισμού	Ακριβής ορισμός των χειρωνακτικών συστατικών, δηλαδή επίπεδο διαδραστικότητας

Πίνακας 3: Ουσιώδεις προδιαγραφές για την προτυποποίηση των αυτόματων συστημάτων

	Επιπρόσθετες χρήσιμες πληροφορίες	Περιγραφή
1	Λογισμικό	Περαιτέρω εφαρμογές που μπορούν να ολοκληρώσουν την FISH ανάλυση (π.χ., ανοσοφαινότυπος)
2	Ανάκτηση εικόνας	Χρόνος ολοκλήρωσης: σταθερός ή αυτόματα προσαρμοζόμενος, μέγεθος οπτικού πεδίου
3	Επεξεργασία εικόνας	Μαθηματικός τύπος αλγορίθμου εάν είναι διαθέσιμος
4	Κατάτμηση πυρήνα	Προβλήματα και αντιμετώπιση προβλημάτων, π.χ. εφαπτόμενοι και επικαλυπτόμενοι πυρήνες,
5	Αναγνώριση σήματος	Προβλήματα και αντιμετώπιση προβλημάτων, π.χ. χαμηλή ένταση, διαιρεμένα και εφαπτόμενα σήματα
6	Αξιολόγηση μορφής σήματος	Προβλήματα και αντιμετώπιση προβλημάτων, π.χ. τυχαία συν-τοποθέτηση
7	Καταμέτρηση δεδομένων που αναλύθηκαν	Ποσοστό των αντικειμένων που χάνονται κατά τη διάρκεια της ανίχνευσης ή που αποκλείονται κατά την αξιολόγηση, οι πιθανές επιπτώσεις τους στο τελικό αποτελέσματα
8	Σύγκριση με μη αυτόματη ανάλυση	Ακρίβεια, κόστος, χρόνος δραστηριότητας και απουσίας.
9	Εκπαίδευση	Τύπος δείγματος, καταμέτρηση των εξετασθέντων αντικειμένων ή πεδίων εικόνων με την πυκνότητα των κυττάρων τους, βήματα βελτιστοποίησης
10	Άλλα	Σύγκριση της μετάδοσης και της σκοπιμότητας με αυτές άλλων μεθόδων, κλινική σημασία

Πίνακας 4: Χρήσιμες επιπρόσθετες πληροφορίες για τα αυτόματα συστήματα

## 5.1 Μελλοντικές προοπτικές

Η τεράστια εξέλιξη που αφορά την ανάπτυξη διαφόρων τεχνικών μοριακής γενετικής οδηγεί στα εξής ερωτήματα:

- (i) Ποιο ρόλο θα διαδραματίσει η αυτόματη ανάλυση FISH στη σύγχρονη διαγνωστική;
- (ii) Θα εξελιχθεί ως τεχνική με σταθερές βάσεις ή θα αποτελέσει ακόμα μία υποσχόμενη τεχνική της μοριακής διαγνωστικής που θα εξασθενήσει σιγά-σιγά;

Όσον αφορά το κόστος, έχουν γίνει τεράστιες προσπάθειες για να μειωθεί το κόστος των τεχνικών ανάλυσης των αλληλουχιών του γονιδιώματος μεταλλάσσοντας έτσι όλη τη γενετική διαγνωστική και την έρευνα. Συγκεκριμένα, οι τεχνικές απεικόνισης που βασίζονται στο κύτταρο είναι πιο αποτελεσματικές από τις λοιπές μοριακές τεχνικές και έχουν χαμηλό κόστος. Οι τεχνικές αυτές έχουν οδηγήσει σε:

- διερεύνηση γενετικών στόχων σε ιστολογικά δείγματα, όπου, στις περισσότερες των περιπτώσεων, η τοπογραφία παρέχει σημαντικές διαγνωστικές πληροφορίες,
- συνδυασμένη έρευνα μορφολογίας, φαινοτύπου και γονοτύπου σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου,
- άμεση εκτίμηση της αναλογίας του γενετικά μη φυσιολογικού πληθυσμού,
- αποκάλυψη κλωνικής ετερογένειας και διακλάδωσης υπο-κλωνικής αρχιτεκτονικής στους όγκους που έχει συγκεντρώσει αρκετό ενδιαφέρον στον τομέα της μοντέρνας έρευνας του καρκίνου (Anderson, et al., 2011) (Greaves & Maley, 2012).

Το κόστος της εγκατάστασης ενός αυτόματο συστήματος ανάλυσης εικόνας FISH φαίνεται ότι κυμαίνεται γύρω στις 150000\$ με επιπρόσθετη χρέωση της ετήσιας αναβάθμισης και συντήρησης. Στην εικόνα 31 βλέπουμε την προσφορά δύο ανταγωνιστικών εταιρειών στην προκήρυξη ζήτησης αυτόματου συστήματος καταμέτρησης σπέρματος από μία αμερικάνικη εταιρεία.

Υπογραμμίζουμε το ολικό κόστος και την ξεχωριστή χρέωση στην εγκατάσταση και στη συντήρηση του συστήματος.

Μολονότι, η υπο-κλωνική πολυμορφία των διαφόρων όγκων μπορεί να ανιχνευθεί χρησιμοποιώντας ειδικές τεχνικές αλληλουχίας σύνθεσης με τη χρήση πυροφωσφορικών (Campbell, et al., 2008), αυτή η μοριακή γενετική τεχνική παρέχει πληροφορίες στο επίπεδο του μορίου αντί του κυττάρου. Για να προσδιορισθούν με ακρίβεια τα αίτια που οδήγησαν στην ετερογένεια είναι απαραίτητη η εφαρμογή τεχνικής μελέτης γονοτύπου μεμονωμένου κυττάρου.

Εναλλακτικός τρόπος αυτόματης FISH ανάλυσης στο μέλλον θα μπορούσε να είναι η τεχνική απεικόνισης-ροής που συνδυάζει την ταχύτητα της κυτταρομετρίας ροής με την απόκτηση της εικόνας της μικροσκοπίας (Ortyn, et al., 2007). Η τεχνολογία είναι ικανή να ανιχνεύσει αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες (ανευσωμίες) ωστόσο, προς το παρόν, δεν μπορεί να αναλύσει ακριβώς ισορροπημένες δομικές παρεκκλίσεις λόγω της χαμηλής ανάλυσης των εικόνων που προκαλείται από την υψηλή ταχύτητα και την παραμόρφωση των κυττάρων. Η αντιμετώπιση αυτής της πρόκλησης θα μπορούσε να ανοίξει μια νέα διάσταση για την υψηλής απόδοσης FISH ανάλυση.

DALLAS COUNTY BID TABULATION		VENDOR #1		VENDOR #2	
BID NO.: 2010-076-5181 PURCHASE OF AUTOMATED MICROSCOPE SPERM DETECTION SYSTEM OPENING DATE: AUGUST 23, 2010 CONTRACT PERIOD: One Time Purchase MWBE STATUS TAXPAYER STATUS BID NOTIFICATION		METASYSTEMS GROUP, INC. John Forte, President 300 Bear Hill Road Warren, MA 02451 617.924.9950 Fax: 617.924.9950 jforte@metasystems.org www.metasystems.org		NICHE VISION FORENSICS, LLC Luigi Annagida, CEO 526 S. Main St., Suite 714G Akron, OH 44311 330.252.2711 Fax: 330.252.2713 luigi@nichevision.com www.nichevision.com	
1	Metater MetaCyte system (or equal) Specify equipment bid & submit literature	ESTIMATED QUANTITY	1 ea	\$ 109,900.00	
2	Installation		1 ea	Included	\$ 5,000.00
TOTAL				\$ 109,900.00	\$ 118,950.00
Include information and current pricing of software updates; Include information and current pricing on equipment maintenance and calibration plans				Software updates are included for 2 years from date of installation at no charge Comprehensive warranty coverage is included for 1 year with purchase. Ongoing support and maintenance will cost approximately \$9,000/year.	
Specify: Time of Completion (include any ordering time for unit, equipment, hardware, material and supplies); All work under this contract shall be completed within _____ calendar days from the date of receipt of purchase order.		90 days		45 days	
Have Product in stock? Cooperative Purchasing? Comments:		Will be required to obtain product upon award Yes Please note, the per unit price above includes 10 software viewer licenses as specified on page 8, sec 5b of this RFP. Standard warranty is 1 year covering all parts and labor. Software upgrade fee of charge for 2 yrs. Customer support by telephone is free for the lifetime of the product. Upgrades, parts, service/support are available for at least 7 years.		Will be required to obtain product upon award Yes Early payment discount 5%, 10 days	
Should your firm be awarded this contract, describe what (if any) portion of the bid requirements will be subcontracted out: Does your company provide health insurance coverage to its employees? Does the company share in the cost a minimum of 75% for employees only Is the coverage comparable to the services provided by Dallas County as described in the summary plan description? Does each of the subcontractors provide health insurance		None Yes Yes Yes N/A		No No	

Εικόνα 31: Προσφορά αυτόματου συστήματος καταμέτρησης σπέρματος σε αμερικάνικη εταιρεία

# Κεφάλαιο 6

## Επίλογος

---

Στο πρόσφατο παγκόσμιο συνέδριο των Μοριακών Παθολογοανατόμων (AMP 2016 Annual Meeting - Association for Molecular Pathology) ο βοηθός διευθυντής Subhadra Nandula, του τμήματος Κυτταρογενετικής και Μοριακής Διαγνωστικής της εταιρείας Cancer Genetics, Inc. μεταξύ άλλων δήλωσε για την αναγκαιότητα των συστημάτων αυτόματης ανάλυσης εικόνων FISH ότι: «με την αυξανόμενη πίεση που ασκείται στα εργαστήρια για να ψηφιοποιηθεί η εργαστηριακή τεκμηρίωση, ανάλυση και υποβολή εκθέσεων, μαζί με την αυξανόμενη ανάγκη για βελτίωση της επικοινωνίας μεταξύ των εμπειρογνομόνων πολλαπλών ειδικοτήτων που εμπλέκονται στην ανάλυση εικόνων FISH, η εισαγωγή της συγκεκριμένης τεχνολογίας παρέχει μια λύση που γεφυρώνει το χάσμα μεταξύ εργαστηρίου, παθολογοανατόμων και παροχών υγείας. Διευκολύνοντας, απλοποιώντας και κάνοντας την αναθεώρηση των αποτελεσμάτων και την ανάλυση των διαδικασιών προσβάσιμη από οποιαδήποτε θέση, η αναθεώρηση της ανάλυσης και των εκθέσεων πέρα από τα πρότυπα προγράμματα περιήγησης βελτιώνει την αποδοτικότητα και παραγωγικότητα, καθώς και τη συνεργασία μεταξύ εμπειρογνομόνων. Τελικά, η καλύτερη επικοινωνία σε όλη τη ροή εργασίας αυξάνει την ποιότητα των παραγόμενων αποτελεσμάτων»<sup>13</sup>.

Για τη συγγραφή της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής εργασίας χρησιμοποιήθηκε όλη η υπάρχουσα προσβάσιμη βιβλιογραφία που υπάρχει στο διαδίκτυο. Σκοπός της είναι η ανάλυση των σχετικών δημοσιευμένων άρθρων στοχεύοντας στην παρουσία των τεχνικών που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση εικόνων FISH. Η εργασία εκτός της παρουσίασης των πιο σύγχρονων τεχνικών και εφαρμογών συμπεριλαμβάνει κυρίως το τρόπο με τον οποίο η κάθε τεχνική επηρεάζει την αποτύπωση της εικόνας και τι αντίκτυπο έχει αυτή η απεικόνιση στην καθημερινή πρακτική της Ιατρικής επιστήμης. Πιο αναλυτικά

---

<sup>13</sup> <http://bioview.com/wp-content/uploads/2016/11/Web-Based-FISH-Analysis-and-Review-AMP2016-workshop.pdf>

παρουσιάζεται η τεχνική FISH και οι βασικές εφαρμογές της με παραδείγματα. Σχολιάζεται η μη-αυτόματη τεχνική FISH και αναλύονται λεπτομερώς οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται κατά τη διαδικασία της αυτόματης ανάλυσης εικόνων FISH παρουσιάζοντας παραδείγματα που αποτυπώνουν τη χρησιμότητα στην Ιατρική πρακτική, τόσο στο διαγνωστικό όσο και στον ερευνητικό τομέα. Οι ποικίλες εφαρμογές αυτόματης επεξεργασίας και ανάλυσης εικόνων FISH που παρουσιάζονται αναδεικνύουν τη σημαντικότητα της χρήσης της στη διάγνωση, σταδιοποίηση μίας νόσου, έρευνα, και παρακολούθηση αποτελέσματος της θεραπείας. Η σύγκριση μεταξύ αυτόματης και συμβατικής ανάλυσης εικόνων FISH γίνεται παραθέτοντας παραδείγματα από διαθέσιμα στο εμπόριο συστήματα. Αναλύονται τα πλεονεκτήματα της αυτόματης επεξεργασίας και ανάλυσης εικόνων FISH καθώς επίσης και τα ουσιώδη εμπόδια που δεν αφήνουν την επέκταση της χρήσης της. Παράλληλα παρουσιάζονται οι απαραίτητες πληροφορίες και χαρακτηριστικά ενός συστήματος αυτόματης επεξεργασίας και ανάλυσης εικόνων FISH και επισημαίνεται η ανάγκη της προτυποποίησης και της δημιουργίας πρωτοκόλλων για όλα τα στάδια αυτής. Τέλος, γίνεται νύξη σε μελλοντικές προεκτάσεις.

Η αυτοματοποιημένη αξιολόγηση της εικόνας FISH είναι μια χρήσιμη τεχνολογία, με σαφείς ενδείξεις, ακόμη και υπό το πρίσμα της ραγδαίας εξέλιξης στις μοριακές γενετικές μεθοδολογίες που βιώνουμε καθημερινά, που θα πρέπει να υπάρχει σε κάθε εργαστήριο μοριακής κυτταρογενετικής. Όσον αφορά την αποδοτικότητα, και συγκεκριμένα την ακρίβεια εντοπισμού ενός σήματος, κάποιος θα πρέπει να κατανοήσει ότι τα ίδια προβλήματα που έκαναν αναγκαία την αυτόματη ανάλυση εικόνων τα ίδια θα εμφανίζονται και κατά τη διάρκεια της «αυτοματοποίησης». Δεδομένου ότι, σχετικά με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, είναι δύσκολο στο εγγύς μέλλον η ακρίβεια της αυτόματης αξιολόγησης να ξεπεράσει αυτήν των ανθρώπων, η εντατική δουλειά και η σχεδόν ανεπιφύλακτη συνέπεια θα πρέπει να είναι «εκ των ων ουκ άνευ» προτερήματα του επιστήμονα που θα χρησιμοποιήσει ένα τέτοιο σύστημα. Παρόλο αυτά η υψηλότερη συσχέτιση ή συνοχή μεταξύ ενός αυτόματου συστήματος και των κυτταρογενετιστών, υποδεικνύουν τη σκοπιμότητα της ανάπτυξης και εφαρμογής των αυτόματων μεθόδων ανάλυσης FISH εικόνων.

Ένα αυτόματο σύστημα, στο μέλλον, θα πρέπει να είναι στην υπηρεσία των βασικών κλινικών ερευνών (διαγνωστική διαδικασία) με εύκολο χειρισμό. Ωστόσο, πρέπει επίσης να εμπεριέχεται μία πλατφόρμα πειραματικής κυτταρομετρίας που να βασίζεται στη μελέτη επιχρισμάτων.

Στο εγγύς μέλλον, οι συνθήκες και η αναφορά των αποτελεσμάτων (συμπεριλαμβανομένης της ονοματολογίας) κάθε έρευνας που περιέχει χρήση αυτόματων αναλυτών, είτε αυτές είναι τεχνικά πειράματα είτε κλινικές μελέτες, θα πρέπει να τυποποιηθούν σε ένα έγγραφο εγκεκριμένο και αναθεωρημένο από ομάδα εμπειρογνομόνων. Η ανάγκη για τυποποίηση των πειραματικών βημάτων, για κοινό λεξιλόγιο και για καταγραφή κατευθυντήριων οδηγιών είναι ο ακρογωνιαίος λίθος πάνω στον οποίο θα στηριχθεί η μελλοντική αναγνώριση της αυτόματης ανάλυσης εικόνας FISH ως μίας απαραίτητης τεχνικής ενός μοριακού γενετικού εργαστηρίου.

Η τεχνική FISH κέρδισε ευρεία αναγνώριση ως μία φυσική τεχνική χαρτογράφησης στηρίζοντας μεγάλης κλίμακας επιτεύγματα που αφορούν τη μελέτη γονιδιώματος. Ωστόσο, η ακρίβεια και η προσαρμοστικότητα της τεχνικής είχε ως αποτέλεσμα την αξιοποίηση της σε άλλους τομείς των βιολογικών και ιατρικών ερευνών. Ως αποτέλεσμα, μια πληθώρα διαφορετικών εφαρμογών και διαγνωστικών δοκιμασιών που βασίζονται στο FISH έχουν αναπτυχθεί σε διάφορους τομείς της έρευνας, συμπεριλαμβανομένης της κλινικής γενετικής, των νευροεπιστημών, της αναπαραγωγικής ιατρικής, της τοξικολογίας, της μικροβιακής οικολογίας, της εξελικτικής βιολογίας, της συγκριτικής γονιδιωματικής, της κυτταρικής γονιδιωματικής και της βιολογίας του χρωμοσώματος.

Η συγκεκριμένη διατριβή εστιάζει στις διάφορες μεθόδους που έχουν χρησιμοποιηθεί για την αυτοματοποίηση της επεξεργασίας και ανάλυσης εικόνων FISH δίνοντας παραδείγματα εφαρμογών που αποδεικνύουν την ευελιξία της τεχνικής FISH και τη χρήση της στην βιοϊατρική έρευνα τις τελευταίες τρεις δεκαετίες. Το αρχικό πρωτόκολλο FISH έχει διαφοροποιηθεί σε εντυπωσιακό αριθμό διαδικασιών που βελτιώνουν την ευαισθησία, εξειδίκευση και ανάλυση της τεχνικής. Οι παραλλαγές αυτές οφείλονται σε αλληλένδετους

παράγοντες όπως η καλύτερη κατανόηση των χημικών και φυσικών ιδιοτήτων των νουκλεϊκών οξέων και της χρωματίνης, η πρόοδος στους τομείς της φθορίζουσας μικροσκοπησης φθορισμού και ψηφιακής απεικόνισης, καθώς και η αυξανόμενη διαθεσιμότητα των πόρων βιοπληροφορικής.

Η μελλοντική επέκταση της παρούσας διατριβής θα εστιάσει στη μελέτη των διαφόρων παραλλαγών της τεχνικής FISH. Η τεχνική ανανεώνεται με ταχείς ρυθμούς παρουσιάζοντας καινούργιες παραλλαγές στην ερευνητική κοινότητα, συμπεριλαμβάνοντας μεταξύ άλλων τις ACM-FISH, armFISH, CARD-FISH, catFISH, CB-FISH, CO-FISH, COBRA-FISH, Cryo-FISH, e-FISH, Flow-FISH, Halo-FISH, Immuno-FISH, Q-FISH, Reverse-FISH, Raman-FISH, T-FISH, 3-D FISH κ.α. Πρόσφατα αναπαράχθησαν μικρορρευστονικές συσκευές για μικρογραφικές αυτόματες FISH εφαρμογές (Kao, et al., 2015). Η επικύρωση αυτών των συσκευών στο εγγύς μέλλον και η διαθεσιμότητα ανιχνευτών ειδικών για συγκεκριμένα νοσήματα θα ενισχύσουν περαιτέρω και θα επεκτείνουν τις διαγνωστικές FISH εφαρμογές. Μελλοντικά, οι έρευνες φαίνεται να εστιάζουν στις καινοτόμες τεχνικές επεξεργασίας και ανάλυσης εικόνων που έχουν προταθεί για τις παραλλαγές της τεχνικής FISH δίνοντας έμφαση στην πρόοδο προς την επίτευξη αυτόματων συστημάτων έτοιμα για χρήση στην κλινική πράξη.

## Βιβλιογραφία

- Adiga, P. & Chaudhuri, B., 1999. Efficient cell segmentation tool for confocal microscopy tissue images and quantitative evaluation of FISH signals.. *Microsc Res Tech.* , 44(1), pp. 49-68.
- Allalou, A. & Wählby, C., 2009. BlobFinder, a tool for fluorescence microscopy image cytometry.. *Comput Methods Programs Biomed.* , 94(1), pp. 58-65.
- Alpár, D., Hermes, J., Póto, L. & al., e., 2008. Automated FISH analysis using dual-fusion and break-apart probes on paraffin-embedded tissue sections.. *Cytometry A*, 73(7), pp. 651-7.
- Alpár, D., Kajtár, B., Kneif, M. & al., e., 2007. Automated detection of residual leukemic cells by consecutive immunolabeling for CD10 and fluorescence in situ hybridization for ETV6/RUNX1 rearrangement in childhood acute lymphoblastic leukemia.. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007 Feb;173(1):23-30., 173(1), pp. 23-30.
- Amare, P., Baisane, C., Saikia, T. & al., e., 2001. Fluorescence in situ hybridization: a highly efficient technique of molecular diagnosis and predication for disease course in patients with myeloid leukemias.. *Cancer Genet Cytogenet*, 131(2), pp. 125-34.
- Anderson, K., Lutz, C., van Delft, F. & al, e., 2011. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia.. *Nature.*, 469(7330), pp. 356-61.
- Baumgartner, A., Schmid, T., Maerz, H. & al., e., 2001. Automated evaluation of frequencies of aneuploid sperm by laser-scanning cytometry (LSC).. *Cytometry.* , 44(2), pp. 156-60.
- Benke, C., Reintjes, G., Schattenhofer, M. & al, e., 2016. Modification of a High-Throughput Automatic Microbial Cell Enumeration System for Shipboard Analyses.. *Appl Environ Microbiol.*, 82(11), pp. 3289-96.
- Bielorai, B., Golan, H., Trakhtenbrot, L. & al, e., 2002. Combined analysis of morphology and fluorescence in situ hybridization in follow-up of minimal residual disease in a child with Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia.. *Cancer Genet Cytogenet.*, 138(1), pp. 64-8.
- Biosystems, L., 2017. *CytoVision Automated Cytogenetics Platform*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: <http://www.leicabiosystems.com/clinical-microscopy-surgery-radiology/cytogenetics/products/cytovision/>  
[Πρόσβαση 14 July 2017].
- BioView, 2014. *BioView-Brochure-HIGH*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: [https://bioview.com/wp-content/uploads/2015/10/2014\\_17\\_05-BioView-Brochure-HIGH.pdf](https://bioview.com/wp-content/uploads/2015/10/2014_17_05-BioView-Brochure-HIGH.pdf)  
[Πρόσβαση 2015 October 2015].

- Blandin, A., Mühlematter, D., Bougeon, S. & al., e., 2008. Automated four-color interphase fluorescence in situ hybridization approach for the simultaneous detection of specific aneuploidies of diagnostic and prognostic significance in high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia.. *Cancer Genet Cytogenet.* , 186(2), pp. 69-77.
- Brown, L. & Huntsman, D., 2007. Fluorescent in situ hybridization on tissue microarrays: challenges and solutions.. *J Mol Histol.*, 38(2), pp. 151-7.
- Campbell, P., Pleasance, E., Stephens, P. & al, e., 2008. Subclonal phylogenetic structures in cancer revealed by ultra-deep sequencing.. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 105(35), pp. 13081-6.
- Canela, A., Vera, E., Klatt, P. & Blasco, M., 2007. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies.. *Proc Natl Acad Sci U S A.* , 104(13), pp. 5300-5.
- Carothers, A., 1994. Counting, measuring, and mapping in FISH-labelled cells: sample size considerations and implications for automation.. *Cytometry.*, 16(4), pp. 298-304.
- Carrell, D., 2008. The clinical implementation of sperm chromosome aneuploidy testing: pitfalls and promises.. *J Androl.*, 29(2), pp. 124-33.
- Carrell, D. & Emery, B., 2008. Use of automated imaging and analysis technology for the detection of aneuploidy in human sperm.. *Fertil Steril.*, 90(2), pp. 434-7.
- Chase, A., Grand, F., Zhang, J. & al., e., 1997. Factors influencing the false positive and negative rates of BCR-ABL fluorescence in situ hybridization.. *Genes Chromosomes Cancer.* , 18(4), pp. 246-53.
- Chawla, M., Lin, G., Olson, K. & al., e., 2004. 3D-catFISH: a system for automated quantitative three-dimensional compartmental analysis of temporal gene transcription activity imaged by fluorescence in situ hybridization.. *J Neurosci Methods.* , 139(1), pp. 13-24.
- Cheung, V. και συν., 2001. Integration of cytogenetic landmarks into the draft sequence of the human genome.. *Nature*, 409(6822), pp. 953-8.
- Conchello JA, L. J., 2005. Optical sectioning microscopy.. *Nat Methods.*, 2(12), pp. 920-31.
- Cremer, C., Remm, B., Bischoff, A. & Vollweiler, T., 1992. Automated detection of radiation-induced chromosome aberrations following fluorescence in situ hybridization.. *J Radiat Res.* , Τόμος 33, pp. 189-205.
- Dewald, G., Stallard, R., Al Saadi, A. & al., e., 1998. A multicenter investigation with interphase fluorescence in situ hybridization using X- and Y-chromosome probes.. *Am J Med Genet.* , 76(4), pp. 318-26.
- Ellis, C., Dyson, M., Stephenson, T. & Maltby, E., 2005. HER2 amplification status in breast cancer: a comparison between immunohistochemical staining and fluorescence in situ hybridisation using manual and automated quantitative image analysis scoring techniques.. *J Clin Pathol.*, 58(7), pp. 710-4.

- Erlecke, J., Hartmann, I., Hoffmann, M. & al., e., 2009. Automated detection of residual cells after sex-mismatched stem-cell transplantation - evidence for presence of disease-marker negative residual cells.. *Mol Cytogenet.* , Τόμος 2, p. 12.
- Evans, M., Sharp, M., Tepperberg, J. & al., e., 2006. Automated microscopy of amniotic fluid cells: detection of FISH signals using the FastFISH imaging system.. *Fetal Diagn Ther.*, 21(6), pp. 523-7.
- Fernández, J., Goyanes, V., López-Fernández, C. & al, e., 1996. Quantification of C-ERB-B2 gene amplification in breast cancer cells using fluorescence in situ hybridization and digital image analysis.. *Cancer Genet Cytogenet.* , 86(1), pp. 18-21.
- Gaiser, T., Berroa-Garcia, L., Kemmerling, R. & al, e., 2011. Automated analysis of protein expression and gene amplification within the same cells of paraffin-embedded tumour tissue.. *Cell Oncol.*, 34(4), pp. 337-42.
- Genetics, A. C. o. M., 2012. *Standards and Guidelines for Clinical Genetics*. [Ηλεκτρονικό] Available at: [http://www.acmg.net/Pages/ACMG\\_Activities/stds-2002/stdsmenu-n.htm](http://www.acmg.net/Pages/ACMG_Activities/stds-2002/stdsmenu-n.htm) [Πρόσβαση 11 April 2012].
- Greaves, M. & Maley, C., 2012. Clonal evolution in cancer.. *Nature.*, 481(7381), pp. 306-13.
- Grigoryan, A., Dougherty, E., Kononen, J. & al., e., 2002. Morphological spot counting from stacked images for automated analysis of gene copy numbers by fluorescence in situ hybridization.. *J Biomed Opt*, 7(1), pp. 109-22.
- Guber, A., Greif, J., Rona, R. & al, e., 2010. Computerized analysis of cytology and fluorescence in situ hybridization (FISH) in induced sputum for lung cancer detection.. *Cancer Cytopathol.*, 118(5), pp. 269-77.
- Gudla, P., Nandy, K., Collins, J. & al, e., 2008. A high-throughput system for segmenting nuclei using multiscale techniques.. *Cytometry A.* , 73(5), pp. 451-66.
- Gué, M., Messaoudi, C., Sun, J. & al, e., 2005. Smart 3D-FISH: automation of distance analysis in nuclei of interphase cells by image processing.. *Cytometry A.*, 67(1), pp. 18-26.
- Hastings, R. και συν., 2007. Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance: a common European framework for quality assessment for constitutional and acquired cytogenetic investigations.. *Eur J Hum Genet.* , 15(5), pp. 525-7.
- Hicks, D. & Tubbs, R., 2005. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretive guidelines.. *Hum Pathol.* , 36(3), pp. 250-61.
- Hieber, L., Huber, R., Bauer, V. & al, e., 2011. Chromosomal rearrangements in post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas: evaluation by spectral karyotyping and automated interphase FISH.. *J Biomed Biotechnol.*, Τόμος 2011, p. 693691.

- Hruska, A., Bollmann, R., Kovacs, R. & al, e., 2004. DNA ploidy and chromosome (FISH) pattern analysis of peripheral nerve sheath tumors.. *Cell Oncol.*, 26(5), pp. 335-45.
- Iannuccelli, E., Mompert, F., Gellin, J. & al, e., 2010. NEMO: a tool for analyzing gene and chromosome territory distributions from 3D-FISH experiments.. *Bioinformatics.* , 26(5), pp. 696-7.
- Ikonisys, 2017. *ikonisys finding the cells that matter*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: <http://www.ikonisys.com/>
- Imaging, A. S., 2017. *GenASIs FISH*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: <http://www.spectral-imaging.com/applications/pathology/fish>  
[Πρόσβαση 14 July 2017].
- Johnson, K., Stroh, H., Khosrotehrani, K. & Bianchi, D., 2007. Spot counting to locate fetal cells in maternal blood and tissue: a comparison of manual and automated microscopy.. *Microsc Res Tech.* , 70(7), pp. 585-8.
- Kajtár, B., Méhes, G., Lörch, T. & al., e., 2006. Automated fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis of t(9;22)(q34;q11) in interphase nuclei.. *Cytometry A.* , 69(6), pp. 506-14.
- Kao, K. και συν., 2015. A fluorescence in situ hybridization (FISH) microfluidic platform for detection of HER2 amplification in cancer cells.. *Biosens Bioelectron.* , Τόμος 69, pp. 272-9.
- Katz, R., Zaidi, T., Fernandez, R. & al., e., 2008. Automated detection of genetic abnormalities combined with cytology in sputum is a sensitive predictor of lung cancer.. *Mod Pathol.*, 21(8), pp. 950-60.
- Kearney, L., 2001. Molecular cytogenetics.. *Best Pract Res Clin Haematol*, Τόμος 14, p. 645–669.
- Kilpatrick, M., Sheehan, C., Marganski, W. & al, e., 2011. Determination of HER2 gene status by fully automated fluorescence microscopy.. *Anal Quant Cytol Histol.*, 33(4), pp. 205-10.
- Kilpatrick, M., Tafas, T., Evans, M. & al, e., 2004. Automated detection of rare fetal cells in maternal blood: eliminating the false-positive XY signals in XX pregnancies.. *Am J Obstet Gynecol.*, 190(6), pp. 1571-8.
- Klewes, L., Hobsch, C., Katzir, N. & al, e., 2011. Novel automated three-dimensional genome scanning based on the nuclear architecture of telomeres. *Cytometry A.*, 79(2), pp. 159-66.
- Knudson RA, S. B. K. R., 2007. Automated Duet spot counting system and manual technologist scoring using dual-fusion fluorescence in situ hybridization (D-FISH) strategy: comparison and application to FISH minimal residual disease testing in patients with chronic myeloid leukemia.. *Cancer Genet Cytogenet.* , 175(1), pp. 8-18.
- Konsti, J., Lundin, J., Jumppanen, M. & al., e., 2008. A public-domain image processing tool for automated quantification of fluorescence in situ hybridisation signals.. *J Clin Pathol.*, 61(3), pp. 278-82.

- Kowalczyk, J., Gaworczyk, A., Winnicka, D. & al., e., 2003. Fluorescence in situ hybridization BCR/ABL fusion signal rate in interphase nuclei of healthy volunteer donors: a test study for establishing false positive rate.. *Cancer Genet Cytogenet*, 142(1), pp. 51-5.
- Kozubek, M., Kozubek, S., Lukášová, E. & al, e., 1999. High-resolution cytometry of FISH dots in interphase cell nuclei.. *Cytometry*, 36(4), pp. 279-93.
- Kozubek, M., Kozubek, S., Lukášová, E. & al, e., 2001. Combined confocal and wide-field high-resolution cytometry of fluorescent in situ hybridization-stained cells.. *Cytometry*, 45(1), pp. 1-12.
- Kumar, G. & Zucker, R., 2008. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Imaging. Στο: *Immunohistochemical (IHC) Staining Methods*. Carpinteria, CA: DAKO, pp. 81-95.
- László, R., Alpár, D., Kajtár, B. & al, e., 2010. Detection of early precursors of t(12;21) positive pediatric acute lymphoblastic leukemia during follow-up.. *Pediatr Blood Cancer*, 54(1), pp. 158-60.
- Lerner, B., 2004. Bayesian fluorescence in situ hybridisation signal classification.. *Artif Intell Med*, 30(3), pp. 301-16.
- Lerner, B., Clocksin, W., Dhanjal, S. & al, e., 2001. Automatic signal classification in fluorescence in situ hybridization images.. *Cytometry*, 43(2), pp. 87-93.
- Lerner, B., Koushnr, L. & Yeshaya, J., 2007. Segmentation and classification of dot and non-dot-like fluorescence in situ hybridization signals for automated detection of cytogenetic abnormalities.. *IEEE Trans Inf Technol Biomed*, 11(4), pp. 443-9.
- Lev, D., Daniely, M., Zudik, A. & al, e., 2005. Automatic scanning of interphase FISH for prenatal diagnosis in uncultured amniocytes.. *Genet Test*, 9(1), pp. 41-7.
- Liew, M., Rowe, L., Clement, P. & al, e., 2016. Validation of break-apart and fusion MYC probes using a digital fluorescence in situ hybridization capture and imaging system. *J Pathol Inform*, 4(7), p. 20.
- Lindsay, A. & David, H., 2007. Fluorescent in situ hybridization on tissue microarrays: Challenges and solutions.. *J Mol Hist*, Τόμος 38, pp. 151-7.
- Lin, G., Adiga, U., Olson, K. & al., e., 2003. A hybrid 3D watershed algorithm incorporating gradient cues and object models for automatic segmentation of nuclei in confocal image stacks.. *Cytometry A*, 56(1), pp. 23-36.
- Lorch, T., Piper, J. & Tomisek, J., 2002. "Tile sampling": A new method for the automated quantitative analysis of samples with high cell density and its application to Her2 scanning.. Stockholm, Sweden, s.n.
- Lukášová, E., Kozubek, S., Kozubek, M. & al, e., 1997. Localisation and distance between ABL and BCR genes in interphase nuclei of bone marrow cells of control donors and patients with chronic myeloid leukaemia. *Human genetics*, 100(5), pp. 525-35.

- Malpica, N., de Solórzano, C., Vaquero, J. & al, e., 1997. Applying watershed algorithms to the segmentation of clustered nuclei.. *Cytometry.* , 28(4), pp. 289-97.
- Marganski, W., El-Sirgany Costa, V., Kilpatrick, M. & al, e., 2011. Digitized microscopy in the diagnosis of bladder cancer: analysis of >3000 cases during a 7-month period.. *Cancer Cytopathol.*, 119(4), pp. 279-89.
- Méhes, G., Luegmayr, A., Kornmüller, R. & al, e., 2003. Detection of disseminated tumor cells in neuroblastoma: 3 log improvement in sensitivity by automatic immunofluorescence plus FISH (AIPF) analysis compared with classical bone marrow cytology.. *Am J Pathol.* , 163(2), pp. 393-9.
- Mertz, J., 2011. Optical sectioning microscopy with planar or structured illumination.. *Nat Methods.* , 8(10), pp. 811-9.
- MetaSystems, 2017. *Innovative Solutions for Automated Imaging | MetaSystems.*  
[Ηλεκτρονικό]  
Available at: <https://metasystems-international.com/>
- Meyer, F., 1979. Iterative image transformations for an automatic screening of cervical smears. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, Τόμος 27, pp. 128-35.
- Moerland E, v. H. R. v. d. A. T., 2006. Detection of HER2 amplification in breast carcinomas: comparison of Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) and Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) combined with automated spot counting.. *Cell Oncol.*, 28(4), pp. 151-9.
- Moore, D., Epstein, L., Reeder, J. & al., e., 1996. Interlaboratory variability in fluorescence in situ hybridization analysis. The NCI Bladder Tumor Marker Network.. *Cytometry*, 25(2), pp. 125-32.
- Narath, R., Lörch, T., Greulich-Bode, K. & al., e., 2005. Automatic telomere length measurements in interphase nuclei by IQ-FISH.. *Cytometry A.*, 68(2), pp. 113-20.
- Narath, R., Lörch, T., Rudas, M. & Ambros, P., 2004. Automatic quantification of gene amplification in clinical samples by IQ-FISH.. *Cytometry B Clin Cytom.*, 57(1), pp. 15-22.
- Nederlof, P., van der Flier, S., Verwoerd, N. & al, e., 1992. Quantification of fluorescence in situ hybridization signals by image cytometry.. *Cytometry.* , 13(8), pp. 846-52.
- Netten, H., van Vliet, L., Vrolijk, H. & al, e., 1998. Fluorescent dot counting in interphase cell nuclei.. *Biolmaging*, Τόμος 4, pp. 93-106.
- Netten, H., Young, I., van Vliet, L. & al, e., 1997. FISH and chips: automation of fluorescent dot counting in interphase cell nuclei.. *Cytometry*, 28(1), pp. 1-10.
- Ntouroupi, T., Ashraf, S., McGregor, S. & al., e., 2008. Detection of circulating tumour cells in peripheral blood with an automated scanning fluorescence microscope.. *Br J Cancer.* , 99(5), pp. 789-95.

- O'Connor, C., 2008. Cytogeneticists can now go "FISH-ing" for chromosomal abnormalities, which are deletions and duplications that can cause disease. How exactly does FISH work?. *Nature Education*, Jan, p. 171.
- Oosterwijk, J., Knepfle, C., Mesker, W. & al, e., 1998. Strategies for rare-event detection: an approach for automated fetal cell detection in maternal blood.. *Am J Hum Genet.*, 63(6), pp. 1783-92.
- Ortyn, W., Perry, D., Venkatachalam, V. & al, e., 2007. Extended depth of field imaging for high speed cell analysis.. *Cytometry A.*, 71(4), pp. 215-31.
- O'Sullivan, J., Finley, J., Risques, R. & al, e., 2004. Telomere length assessment in tissue sections by quantitative FISH: image analysis algorithms.. *Cytometry A.*, 58(2), pp. 120-31.
- Otsu, N., 1979. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE transactions on systems, man, and cybernetics*, Τόμος 9, pp. 62-66.
- Pajor, G., Alpar, D., Kajtar, B. & al., e., 2012b. Automated signal pattern evaluation of a bladder cancer specific multiprobe-fish assay applying a user-trainable workstation.. *Microsc Res Tech.*, 75(6), pp. 814-20.
- Pajor, G., Kajtár, B., Pajor, L. & Alpár, D., 2012a. State-Of-The-Art FISHing: Automated Analysis of Cytogenetic Aberrations in Interphase Nuclei.. *Cytometry*, 81(8), pp. 649-663.
- Pajor, G., Somogyi, L., Melegh, B. & al, e., 2011. Urovysion: Considerations on modifying current evaluation scheme, including immunophenotypic targeting and locally set, statistically derived diagnostic criteria.. *Cytometry A.*, 79(5), pp. 375-82.
- Pajor, G., Sule, N., Alpar, D. & al, e., 2008. Increased efficiency of detecting genetically aberrant cells by UroVysion test on voided urine specimens using automated immunophenotypical preselection of uroepithelial cells.. *Cytometry A.*, 73(3), pp. 259-65.
- Pardue, M. & Gall, J., 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* , Τόμος 64, pp. 600-4.
- Perry, M., Chen, X. & Lu, X., 2007. Automated scoring of multiprobe FISH in human spermatozoa.. *Cytometry A.*, 71(11), pp. 968-72.
- Perry, M., Chen, X., McAuliffe, M. & al, e., 2011. Semi-automated scoring of triple-probe FISH in human sperm: methods and further validation.. *Cytometry A.* , 79(8), pp. 661-6.
- Piper, J., Lorch, T., Poole, I. & Tomisek, J., 2002. *Computing the Her2:CEP-17 ratio of tumor cells in breast cancer tissue sections by analysis of the FISH spot counts of a tiles sampling.* Stockholm, Sweden, s.n.
- Radziuviene, G. και συν., 2017. Automated Image Analysis of HER2 Fluorescence In Situ Hybridization to Refine Definitions of Genetic Heterogeneity in Breast Cancer Tissue. *BioMed Research International*, p. 2321916.

- Raimondo, F., Gavrielides, M., Karayannopoulou, G. & al., e., 2005. Automated evaluation of Her-2/neu status in breast tissue from fluorescent in situ hybridization images.. *IEEE Trans Image Process.*, 14(9), pp. 1288-99.
- Ram, S., Rodríguez, J. & Bosco, G., 2012. Segmentation and detection of fluorescent 3D spots.. *Cytometry A.* , 81(3), pp. 198-212.
- Reichard, K., Hall, B., Corn, A. & al., e., 2006. Automated analysis of fluorescence in situ hybridization on fixed, paraffin-embedded whole tissue sections in B-cell lymphoma.. *Mod Pathol.* , 19(8), pp. 1027-33.
- Reljin, B., Paskas, M., Reljin, I. & Konstanty, K., 2011. Breast cancer evaluation by fluorescent dot detection using combined mathematical morphology and multifractal techniques.. *Diagn Pathol.* , Τόμος 30, p. 6.
- Ridler, T. & Calvard, S., 1978. Picture thresholding using an iterative selection method. *IEEE trans syst Man Cybern*, Τόμος 8, pp. 630-2.
- Rodenacker, K., Aubele, M., Hutzler, P. & Adiga, P., 1997. Groping for quantitative digital 3-D image analysis: an approach to quantitative fluorescence in situ hybridization in thick tissue sections of prostate carcinoma.. *Anal Cell Pathol.*, 15(1), pp. 19-29.
- Ross, F. και συν., 2012. Report from the European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders.. *Haematologica.* , 97(8), pp. 1272-7.
- Rudkin, G. & Stollar, B., 1977. High resolution detection of DNA-RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence.. *Nature.*, 265(5593), pp. 472-3.
- Rygiel, A., van Baal, J., Milano, F. & al, e., 2007. Efficient automated assessment of genetic abnormalities detected by fluorescence in situ hybridization on brush cytology in a Barrett esophagus surveillance population.. *Cancer.*, 109(10), pp. 1980-8.
- Schröck, E. και συν., 1996. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes.. *Science.*, 273(5274), pp. 494-7.
- Schunck, C. & Mohammad, E., 2011. Automated analysis of FISH-stained HER2/neu samples with Metafer.. *Methods Mol Biol.*, Τόμος 724, pp. 91-103.
- Seppo, A., Frisova, V., Ichetovkin, I. & al., e., 2008. Detection of circulating fetal cells utilizing automated microscopy: potential for noninvasive prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies.. *Prenat Diagn.* , 28(9), pp. 815-21.
- Seppo, A., Jalali, G., Babkowski, R. & al, e., 2009. Gain of 3q26: a genetic marker in low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) of the uterine cervix.. *Gynecol Oncol.*, 114(1), pp. 80-3.
- Shah, S., 2007. Image enhancement for increased dot-counting efficiency in FISH.. *J Microsc.* , 228(2), pp. 211-26.

- Shimoni, A., Nagler, A., Kaplinsky, C. & al, e., 2002. Chimerism testing and detection of minimal residual disease after allogeneic hematopoietic transplantation using the bioView (Duet) combined morphological and cytogenetical analysis.. *Leukemia.*, 16(8), pp. 1413-8.
- Shirley, J., Ty, S., Takebayashi, S. & al, e., 2011. FISH Finder: a high-throughput tool for analyzing FISH images.. *Bioinformatics.*, 27(7), pp. 933-8.
- Sifakis, S., Ghatpande, S., Seppo, A. & al, e., 2010. Prenatal diagnosis of trisomy 21 through detection of trophoblasts in cervical smears.. *Early Hum Dev.*, 86(5), pp. 311-3.
- Smith, G. & Bentz, J., 2010. "FISHing" to detect urinary and other cancers: validation of an imaging system to aid in interpretation.. *Cancer Cytopathol.* , 118(1), pp. 56-64.
- Solórzano, C., Santos, A., Vallcorba, I. & al, e., 1998. Automated FISH spot counting in interphase nuclei: statistical validation and data correction.. *Cytometry.*, 31(2), pp. 93-9.
- Speicher, M. & Carter, N., 2005. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology.. *Nat Rev Genet.* , 6(10), pp. 782-92.
- Stevens, R., Almanaseer, I., Gonzalez, M. & al, e., 2007. Analysis of HER2 gene amplification using an automated fluorescence in situ hybridization signal enumeration system.. *J Mol Diagn.* , 9(2), pp. 144-50.
- Tanke, H., Florijn, R., Vrolijk, J. & Raap, A., 1995a. Molecular cytogenetics: unraveling of the genetic composition of individual cells by fluorescence in situ hybridization and digital imaging microscopy.. *World J Urol.*, 13(3), pp. 138-42.
- Tanke, H., Florijn, R., Wiegant, J. & al., e., 1995b. CCD microscopy and image analysis of cells and chromosomes stained by fluorescence in situ hybridization.. *Histochem J.*, 27(1), pp. 4-14.
- Theodosiou, Z., Kasampalidis, I., Karayannopoulou, G. & al, e., 2008. Evaluation of FISH image analysis system on assessing HER2 amplification in breast carcinoma cases.. *Breast.*, 17(1), pp. 80-4.
- Theodosiou, Z. και ουβ., 2007 . Automated analysis of FISH and immunohistochemistry images: a review.. *Cytometry A.*, 71(7), pp. 7439-50.
- Trask, B., 2002. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting.. *Nat Rev Genet.* , 3(10), pp. 769-78.
- Truong, K., Boenders, J., Maciorowski, Z. & al., e., 1997. Signal amplification of FISH for automated detection using image cytometry.. *Anal Cell Pathol.* , 13(3), pp. 137-46.
- Truong, K., Gibaud, A., Dupont, J. & al, e., 2003. Rapid prenatal diagnosis of Down syndrome using quantitative fluorescence in situ hybridization on interphase nuclei.. *Prenat Diagn.* , 23(2), pp. 146-51.

- Truong, K., Gibaud, A., Zalcmán, G. & al, e., 2004. Quantitative fish determination of chromosome 3 arm imbalances in lung tumors by automated image cytometry.. *Med Sci Monit.*, 10(11), pp. 426-32.
- Tubbs, R., Pettay, J., Swain, E. & al, e., 2006. Automation of manual components and image quantification of direct dual label fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER2 gene amplification: A feasibility study.. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* , 14(4), pp. 436-40.
- Turashvili, G., Leung, S., Turbin, D. & al, e., 2009. Inter-observer reproducibility of HER2 immunohistochemical assessment and concordance with fluorescent in situ hybridization (FISH): pathologist assessment compared to quantitative image analysis.. *BMC Cancer.*, 29(9), p. 165.
- van de Rijke, F., Vrolijk, H., Sloos, W. & al., e., 1996. Sample preparation and in situ hybridization techniques for automated molecular cytogenetic analysis of white blood cells.. *Cytometry.* 1996 Jun 1;24(2):151-7., 24(2), pp. 151-7.
- van der Logt, E., Kuperus, D., van Setten, J. & al, e., 2015. Fully automated fluorescent in situ hybridization (FISH) staining and digital analysis of HER2 in breast cancer: a validation study.. *PLoS One.* 2015 Apr 6;10(4), 10(4), p. e0123201. .
- Varga, V., Ficsor, L., Kamarás, V. & al., e., 2009. Automated multichannel fluorescent whole slide imaging and its application for cytometry.. *Cytometry A.* , 75(12), pp. 1020-30.
- Ventura, R. και συν., 2006. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue.. *J Mol Diagn*, Τόμος 8, pp. 141-51.
- Visia, I., 2014. *XCYTOGEN*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: [http://www.visiainaging.com/cytogenetics\\_XCYTOGEN.php](http://www.visiainaging.com/cytogenetics_XCYTOGEN.php)
- Volpi, E. & Bridger, J., 2008. FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique.. *Biotechniques.* , 45(4), pp. 385-6.
- Vorsanova, S., Yurov, Y. & Iourov, I., 2010. Human interphase chromosomes: A review of available molecular cytogenetic technologies.. *Mol Cytogenet* 2010;3:1, 3(1).
- Wang, X., Zheng, B., Zhang, R. & al, e., 2010. Automated analysis of fluorescent in situ hybridization (FISH) labeled genetic biomarkers in assisting cervical cancer diagnosis.. *Technol Cancer Res Treat.* 2010 Jun;9(3):231-42., 9(3), pp. 231-42.
- Wauters, J., Assche, E., Antsaklis, A. & al., e., 2007. Fully automated FISH examination of amniotic fluid cells.. *Prenat Diagn.* , 27(10), pp. 951-5.
- Wessels, J., Pliquett, U. & Wouters, F., 2012. Light-emitting diodes in modern microscopy--from David to Goliath?. *Cytometry A.* , 81(3), pp. 188-97.
- Wolff, D. και συν., 2007. Guidance for fluorescence in situ hybridization testing in hematologic disorders.. *J Mol Diagn.* , 9(2), pp. 134-43.

Wollman, A., Miller, H., Foster, S. & Leake, M., 2016. An automated image analysis framework for segmentation and division plane detection of single live *Staphylococcus aureus* cells which can operate at millisecond sampling time scales using bespoke Slimfield microscopy.. *Phys Biol.*, 13(5), p. 055002.

Yan, L. και συν., 2009 . Application of three-dimensional fluorescence in situ hybridization to human preimplantation genetic diagnosis.. *Fertil Steril.*, 92(4), pp. 1492-5..

Zhou, Z., Pons, M., Raskin, L. & Zilles, J., 2007. Automated image analysis for quantitative fluorescence in situ hybridization with environmental samples.. *Appl Environ Microbiol.* , 73(9), pp. 2956-62.