

Curve fitting e compensazione per segnali di citometria ad impedenza

Mastrofini Alessandro

alessandro.mastrofini@alumni.uniroma2.eu

Abstract

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut purus elit, vestibulum ut, placerat ac, adipiscing vitae, felis. Curabitur dictum gravida mauris. Nam arcu libero, nonummy eget, consectetur id, vulputate a, magna. Donec vehicula augue eu neque. Pellentesque habitant morbi tristique senectus et netus et malesuada fames ac turpis egestas. Mauris ut leo. Cras viverra metus rhoncus sem. Nulla et lectus vestibulum urna fringilla ultrices. Phasellus eu tellus sit amet tortor gravida placerat. Integer sapien est, iaculis in, pretium quis, viverra ac, nunc. Praesent eget sem vel leo ultrices bibendum. Aenean faucibus. Morbi dolor nulla, malesuada eu, pulvinar at, mollis ac, nulla. Curabitur auctor semper nulla. Donec varius orci eget risus. Duis nibh mi, congue eu, accumsan eleifend, sagittis quis, diam. Duis eget orci sit amet orci dignissim rutrum.

1 Introduzione

I sistemi per l'analisi microfluidica a singola cellula richiedono soluzioni tecnologiche per contare, intrappolare, focalizzare, separare e identificare le proprietà della cellula.

Possono essere identificate le proprietà di singole cellule basandosi su differenze nelle dimensioni e nelle proprietà dielettriche, sfruttando tecniche non invasive e senza richiedere l'ausilio di labelling cellulare.

Tra le differenti tecniche risalta l'analisi di impedenza in microfluidica. Si utilizzano più coppie di elettrodi, poste intorno al canale microfluidico, per applicare una tensione a frequenze discrete e misurare le fluttuazioni della corrente elettrica. Tali fluttuazioni sono dovute al passaggio della cellula all'interno del canale e quindi all'interno del campo elettrico non uniforme generato dagli elettrodi.

Tali sistemi possono essere più o meno accurati a seconda della configurazione utilizzata.

In questo report viene presentata l'analisi di una

tecnica di compensazione per eliminare la dipendenza dalla posizione nel canale che affligge i segnali misurati e non permette una corretta stima del diametro cellulare.

Tale tecnica di compensazione sfrutta la dipendenza del diametro elettrico dal parametro di forma, legato alle proprietà del segnale misurato. Nonostante le diverse famiglie analizzate (differenti diametri) appaiono come segnali non distinguibili il mapping mediante tale procedura di compensazione permette di produrre dei segnali dove le diverse famiglie sono chiaramente distinguibili.

2 Background

Il citometro ad impedenza è un dispositivo microfluidico utilizzato per misurare il campo elettrico all'interno di un microcanale dove passa una cellula. La cellula attraversa un specifico pattern di elettrodi sul quale viene applicata una tensione alternata e questo porta ad una variazione della corrente misurata.

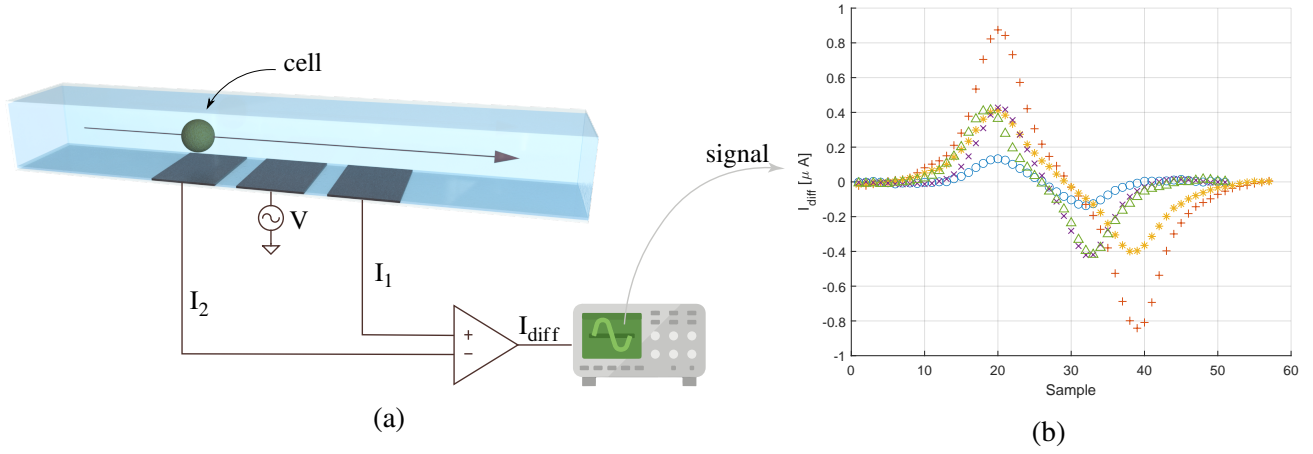


FIG. 1: Schema rappresentativo il citometro ad impedenza con la configurazione di elettrodi selezionata e la cellula passante (a); segnali della corrente differenziale misurata per 5 diversi campioni (b)

Ovvero si considera un microcanale riempito di un buffer conduttivo al cui interno passano delle correnti elettriche. Nel dispositivo in questione si applica un potenziale all'elettrodo centrale e si misura una corrente differenziale tra i due elettrodi laterali.

Si utilizzando basse frequenze per determinare le proprietà sulla dimensione della cellula in quanto il segnale è tipicamente proporzionale al volume cellulare. Alte frequenze, invece, vengono utilizzare per avere informazioni sulla conduttività della membrana cellulare.

Nel seguente report viene considerata una configurazione ad elettrodi coplanari rappresentata in fig. 1.

Tramite la misura di corrente differenziale è possibile stimare alcune proprietà della cellula che passa nel canale. In particolare, al passaggio della cellula, si misura un segnale con una forma d'onda di tipo gaussiana bipolare.

Tramite l'ampiezza di picco è possibile stimare il diametro. Il segnale è proporzionale al volume della cellula per cui il diametro sarà legato all'ampiezza del segnale (a) come:

$$D = Ga^{1/3} \quad (1)$$

Dove G è un guadagno che risente delle proprietà elettriche del citometro.

2.1 Gaussiana bipolare

La gaussiana bipolare è una forma d'onda caratteristica composta da due gaussiane identificata dalla generica equazione:

$$g(t) = a [e^{g_+(t)} - e^{g_-(t)}] \quad (2)$$

Ovvero, considerata un'ampiezza di riferimento a (i.e. il valore massimo di picco), è la somma di due gaussiane nel tempo di cui la seconda ribaltata. La distanza picco-picco è pari a δ e si introduce un parametro di centratura t_c . Le due gaussiane condividono la medesima deviazione standard σ e sono identificate dalle equazioni:

$$g_+(t) = \frac{-(t - (t_c + (\delta/2)))^2}{2\sigma^2} \quad (3)$$

E:

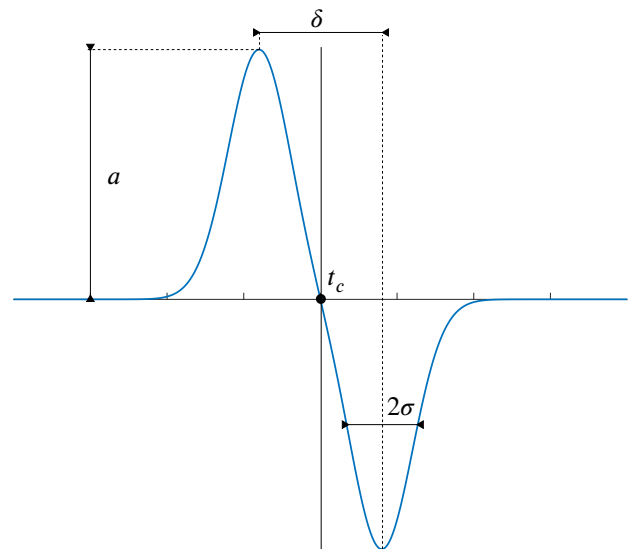


FIG. 2: Forma d'onda di tipo gaussiana bipolare identificata dall'ampiezza a , punto centrare t_c , larghezza a metà altezza 2σ e distanza picco-picco δ .

$$g_{-}(t) = \frac{-\left(t - (t_c - (\delta/2))\right)^2}{2\sigma^2} \quad (4)$$

2.2 Procedura di fitting

Partendo dai dati sperimentali è necessario introdurre una procedura di fitting numerico per identificare la gaussiana, e quindi i suoi quattro parametri descrittivi, tale da rappresentare il segnale analizzato [1].

Tale procedura di fitting viene implementata secondo un algoritmo di ottimizzazione. Ovvero, si cerca di ridurre la differenza tra il dato misurato $[d]_i$ e il template di fitting (g) allo stesso istante temporale.

Definita la funzione di errore come tale differenza:

$$\underline{e} = [d]_i - g_i(t_i, a, t_c, \delta, \sigma) \quad (5)$$

Si cerca di minimizzare la funzione obiettivo definita proprio come la norma dell'errore:

$$E(a, t_c, \delta, \sigma) = \frac{1}{2} \sum_i \left\| d_i - g(t_i, a, t_c, \delta, \sigma) \right\|^2 \quad (6)$$

2.3 Accuratezza

I dispositivi microfluidici possono essere più o meno accurati. Questo è legato alla configurazione degli elettrodi, alla geometria, al mezzo di sospensione e velocità del flusso [2].

In particolare, per il caso di riferimento si osserva una dipendenza del segnale dalla posizione all'interno del canale. Nonostante l'ampiezza del picco della gaussiana sia correlata con il diametro cellulare si osserva una dipendenza anche dalla posizione.

Ovvero, a parità di diametro, una cellula passante vicino agli elettrodi darà un picco di ampiezza maggiore alla stessa cellula passante ad una distanza maggiore [3].

Nonostante nella configurazione utilizzata non si può avere una misura diretta della posizione all'interno del canale è possibile ottenerne una stima effettuando una compensazione del segnale tenendo conto della correlazione tra la posizione e lo shape parameters.

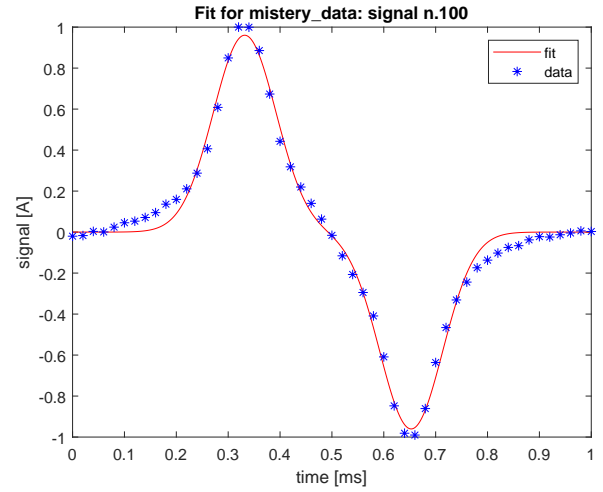


FIG. 3: Grafico dell'andamento temporale del segnale n. 100. In blu i campioni e in rosso il segnale fittato con una gaussiana bipolare

In particolare, risulta valida la relazione tra il parametro di forma $\frac{\sigma}{\delta}$ e il diametro normalizzato che segue una legge lineare:

$$\frac{D}{d} = c_1 + c_2 \left(\frac{\sigma}{\delta} \right) \quad (7)$$

Si possono quindi usare tali coefficienti della retta per correggere il diametro elettrico togliendo l'effetto di posizione [4].

2.4 Dataset di riferimento

Il dataset di riferimento è un insieme di dati grezzi di citometro ad impedenza.

Per il dispositivo in questione il guadagno è pari a $10.5 \mu\text{m} / \text{A}^{1/3}$. I segnali sono campionati con una frequenza $f_s = 115 \text{ kHz}$ con un totale di oltre 50.000 segnali.

Sono presenti i segnali di tre famiglie di biglie di test con diametro nominale di 5.2, 6 e $7 \mu\text{m}$.

3 Risultati

Inizialmente la procedura viene applicata su un dataset ristretto considerando 400 segnali. Vengono selezionati quindi i segnali di indice da 400 a 800.

Successivamente la procedura verrà applicata anche su un riferimento più esteso.

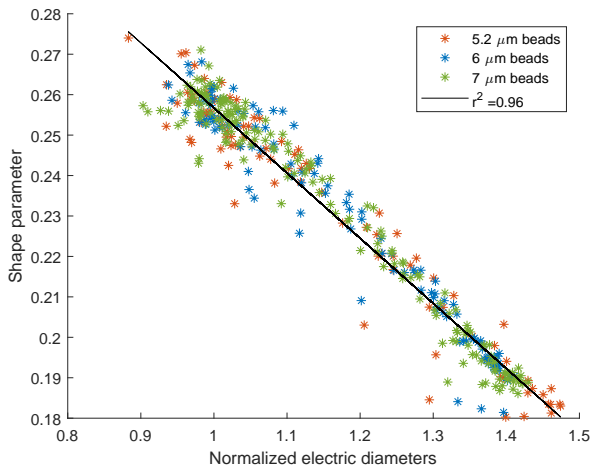


FIG. 4: Andamento dello shape parameter rispetto il diametro normalizzato. Sono raffigurati i campioni delle tre famiglie distinte con colori differenti e la retta ottenuta con una procedura di fitting lineare.

3.1 Fitting numerico

A partire dal singolo segnale all'interno dell'intero dataset è possibile fittare la gaussiana bipolare andando a stimarne i quattro coefficienti descrittivi.

Considerando il template in eq. (2) è possibile utilizzare il comando Matlab `fit()` fornendo il template stesso, i dati e i valori iniziali per la stima ai minimi quadrati.

Inoltre, essendo il segnale molto piccolo $\propto 10^{-6}$ è utile normalizzare il segnale di ampiezza e scalare l'asse dei tempi riportandolo in secondi nel range $[0; \frac{1}{f_s}]$, dove f_s è la frequenza di campionamento il cui inverso indica l'ultimo campione temporale.

A questo deve seguire poi necessariamente una riscalatura nel dominio originario.

Un esempio di fitting è presente in fig. 3.

3.2 Compensazione

Per la procedura di compensazione è necessario stimare i coefficienti di un fitting lineare. Tale fitting deve essere fatto nello spazio $[\frac{\delta}{\sigma}; \frac{D}{d}]$ ed è quindi necessario normalizzare i diametri elettrici rispetto i singoli diametri nominali delle tre famiglie.

Dallo scatter plot del diametro elettrico vs shape parameters è possibile distinguere tre famiglie (fig. 6a). Mediante la funzione `inpolygon()` è possibile selezionare separatamente i valori corrispondenti alle tre famiglie e quindi normalizzarle per il rispettivo diametro nominale.

Quindi è possibile calcolare la retta che meglio

approssima l'andamento dello shape parameter in funzione del diametro elettrico normalizzato (fig. 4). Dunque è possibile estrarre i coefficienti:

- $c1 = 2.59$
- $c2 = -6.20$

E il coefficiente di determinazione $r^2 = 0.96$.

Tramite tali coefficienti è possibile correggere i valori tramite l'eq. (7).

Si ottengono quindi le famiglie separate sia nello scatter plot dello shape parameter che della velocità, in fig. 6 e fig. 7.

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut purus elit, vestibulum ut, placerat ac, adipiscing vitae, felis. Curabitur dictum gravida mauris. Nam arcu libero, nonummy eget, consectetur id, vulputate a, magna. Donec vehicula augue eu neque. Pellentesque habitant morbi tristique senectus et netus et malesuada fames ac turpis egestas. Mauris ut leo. Cras viverra metus rhoncus sem. Nulla et lectus vestibulum urna fringilla ultrices. Phasellus eu tellus sit amet tortor gravida placerat. Integer sapien est, iaculis in, pretium quis, viverra ac, nunc. Praesent eget sem vel leo ultrices bibendum. Aenean faucibus. Morbi dolor nulla, malesuada eu, pulvinar at, mollis ac, nulla. Curabitur auctor semper nulla. Donec varius orci eget risus. Duis nibh mi, congue eu, accumsan eleifend, sagittis quis, diam. Duis eget orci sit amet orci dignissim rutrum.

Nam dui ligula, fringilla a, euismod sodales, sollicitudin vel, wisi. Morbi auctor lorem non justo. Nam lacus libero, pretium at, lobortis vitae, ultricies et, tellus. Donec aliquet, tortor sed accumsan bibendum, erat ligula aliquet magna, vitae ornare odio metus a mi. Morbi ac orci et nisl hendrerit mollis. Suspendisse ut massa. Cras nec ante. Pellentesque a nulla. Cum sociis natoque penatibus et magnis dis parturient montes, nascetur ridiculus mus. Aliquam tincidunt urna. Nulla ullamcorper vestibulum turpis. Pellentesque cursus luctus mauris.

3.3 Distribuzioni

PARLA DELLA SEPARAZIONE DEGLI ISTOGRAMMI E DELLE FAMIGLIE + TABELLA

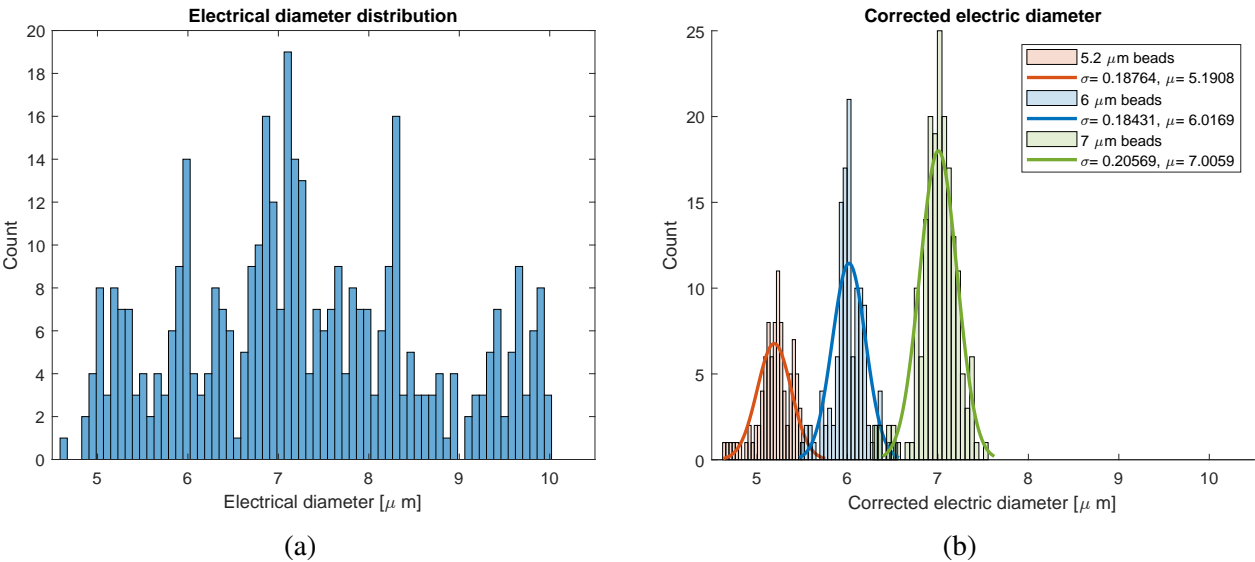


FIG. 5

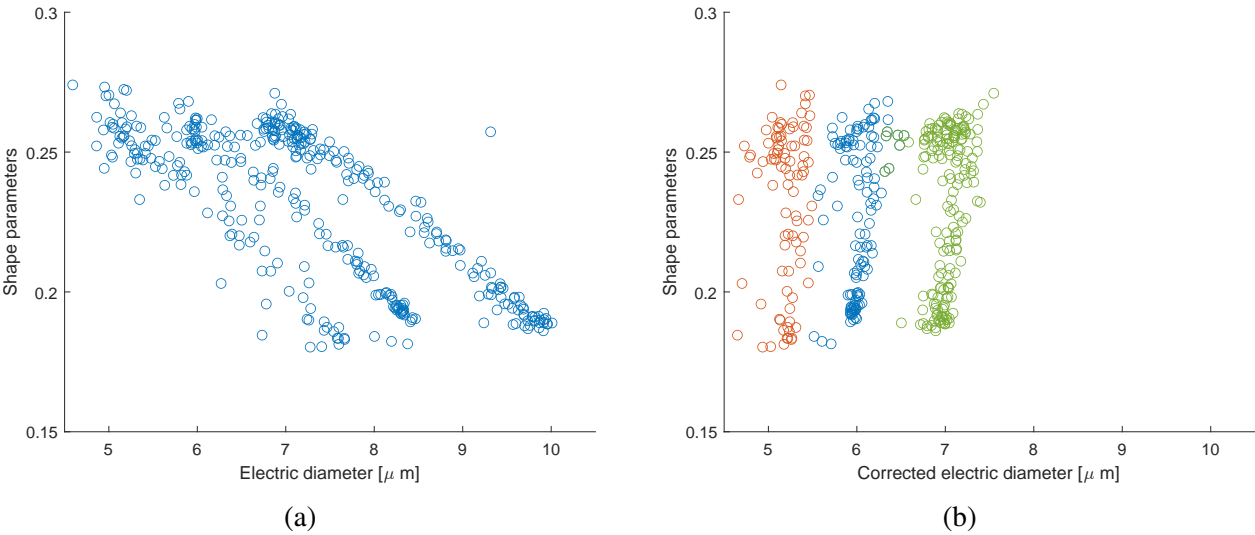


FIG. 6

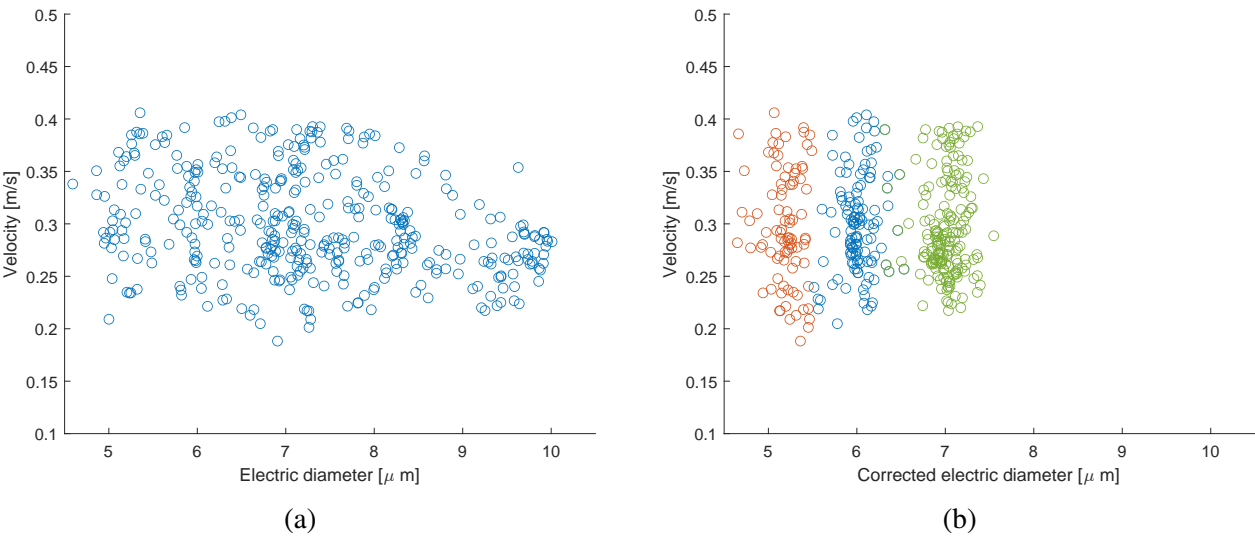


FIG. 7

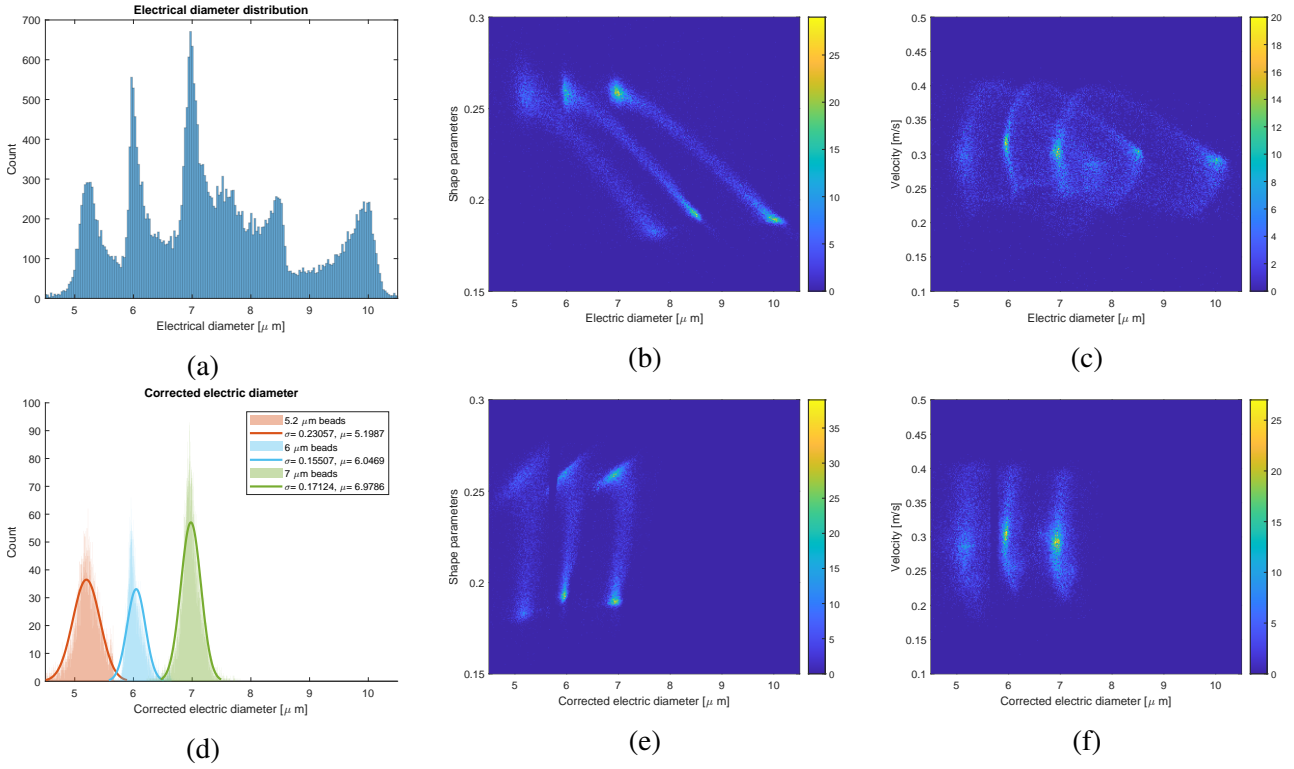


FIG. 8

3.4 Estensione del dominio di interesse 4 Conclusioni

La stessa procedura può essere applicata anche su una quantità di segnali notevolmente maggiore. Vengono quindi considerati, nello stesso dataset di riferimento, i segnali di indice a 200 a 35200.

La procedura può essere applicata allo stesso modo ma gli scatter plot vengono sostituiti da plot di densità che permettono di osservare meglio la distribuzione dei valori.

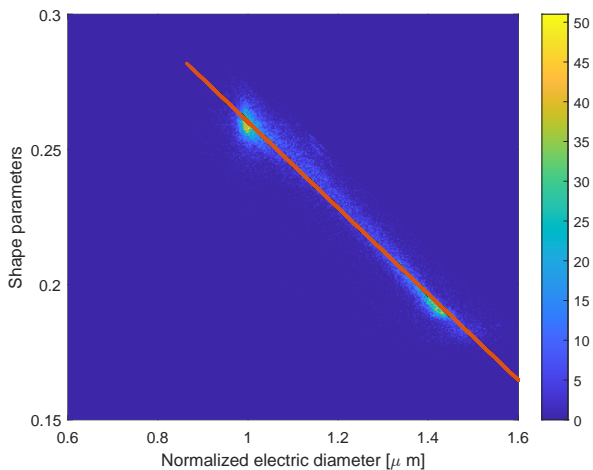


FIG. 9

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut purus elit, vestibulum ut, placerat ac, adipiscing vitae, felis. Curabitur dictum gravida mauris. Nam arcu libero, nonummy eget, consectetur id, vulputate a, magna. Donec vehicula augue eu neque. Pellentesque habitant morbi tristique senectus et netus et malesuada fames ac turpis egestas. Mauris ut leo. Cras viverra metus rhoncus sem. Nulla et lectus vestibulum urna fringilla ultrices. Phasellus eu tellus sit amet tortor gravida placerat. Integer sapien est, iaculis in, pretium quis, viverra ac, nunc. Praesent eget sem vel leo ultrices bibendum. Aenean faucibus. Morbi dolor nulla, malesuada eu, pulvinar at, mollis ac, nulla. Curabitur auctor semper nulla. Donec varius orci eget risus. Duis nibh mi, congue eu, accumsan eleifend, sagittis quis, diam. Duis eget orci sit amet orci dignissim rutrum.

Disponibilità dei dati

Il materiale è disponibile alla repository online del progetto: <https://github.com/mastroalex/curve-fitting>

Riferimenti

- [1] Federica Caselli and Paolo Bisegna. “A Simple and Robust Event-Detection Algorithm for Single-Cell Impedance Cytometry”. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 63.2 (Feb. 2016), pp. 415–422. ISSN: 0018-9294, 1558-2531. DOI: 10 . 1109 / TBME . 2015 . 2462292. URL: [http : / / ieeexplore . ieee . org / document / 7169531/](http://ieeexplore.ieee.org/document/7169531/) (visited on 06/04/2022).
- [2] Tao Sun and Hywel Morgan. “Single-cell microfluidic impedance cytometry: a review”. en. In: *Microfluidics and Nanofluidics* 8.4 (Apr. 2010), pp. 423–443. ISSN: 1613-4982, 1613-4990. DOI: 10 . 1007 / s10404 - 010 - 0580 - 9. URL: [http : // link . springer . com / 10 . 1007 / s10404 - 010 - 0580 - 9](http://link.springer.com/10.1007/s10404-010-0580-9) (visited on 06/04/2022).
- [3] Daniel Spencer et al. “High accuracy particle analysis using sheathless microfluidic impedance cytometry”. en. In: *Lab on a Chip* 16.13 (2016), pp. 2467–2473. ISSN: 1473-0197, 1473-0189. DOI: 10 . 1039 / C6LC00339G. URL: [http : / / xlink . rsc . org / ?DOI = C6LC00339G](http://xlink.rsc.org/?DOI=C6LC00339G) (visited on 06/04/2022).
- [4] Vito Errico et al. “Mitigating positional dependence in coplanar electrode Coulter-type microfluidic devices”. en. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 247 (Aug. 2017), pp. 580–586. ISSN: 09254005. DOI: 10 . 1016 / j . snb . 2017 . 03 . 035. URL: [https : // linkinghub . elsevier . com / retrieve / pii / S0925400517304525](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400517304525) (visited on 03/19/2022).