

## TECHNOLOGIA *IMAGESTREAM* – KROK DALEJ NIŻ CYTOMETRIA PRZEPŁYWOWA

### IMAGE STREAM TECHNOLOGY – A STEP FURTHER THAN FLOW CYTOMETRY

Ewa K. ZUBA-SURMA<sup>1</sup>, Magdalena KUCIA<sup>1</sup>, Mariusz Z. RATAJCZAK<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Stem Cell Biology Program, University of Louisville, Louisville, KY, USA;

<sup>2</sup>Zakład Fizjologii, Pomorska Akademia Medyczna, Szczecin, Polska

**Streszczenie:** Technologia IS (*ImageStream*) stanowi nowe narzędzie pomiarowe dla wieloparametrowej analizy komórek. System łączy w sobie cechy cytometru przepływowego oraz mikroskopu fluorescencyjnego współpracującego z nowoczesnym systemem analizy obrazu. Podobnie jak cytometr przepływowy, IS umożliwia analizę wielu obiektów komórkowych oferując statystyczną ich analizę pod kątem podstawowych parametrów fluorescencyjnych. Dodatkowo dzięki zapisowi rzeczywistego obrazu komórek umożliwia ich kompleksową ocenę morfometryczną, a następnie jej korelację z cechami fotometrycznymi komórek. Zgodnie z powyższym, *ImageStream* jest cytometrem przepływowym „fotografującym” analizowane obiekty i umożliwiającym wieloparametrową ocenę zapisanych obrazów. Stwarza on nowe możliwości zastosowania, szczególnie tam, gdzie cytometr przepływowy nie daje pełnej, pożądanej informacji o charakterystyce badanych obiektów. Celem poniższego artykułu jest przybliżenie *ImageStream* osobom pracującym z systemami analizy obrazu komórek oraz cytometrią przepływową, przez podanie w skrócie podstawowych informacji o systemie oraz jego możliwych zastosowaniach.

**Słowa kluczowe:** *ImageStream*, cytometria przepływowa, cyfrowa analiza obrazu, morfometria.

**Summary:** The *ImageStream* technology was developed as a novel tool for multiparameter cell analysis. The system fully integrates the features of flow cytometry and fluorescent microscopy combined with a modern system of image analysis. Similarly to flow cytometry, the *ImageStream* allows analyzing of a large number of cells according to their fluorescent features and provides statistical analysis of these objects. Additionally, allows detailed morphometric analysis of cells based on their images collected during acquisition as well as correlation of various morphometric and photometric features of the cells. Simply, the *ImageStream* system is a flow cytometer collecting images of cells during their acquisition that allows their further multiparameter analysis. The innovative features of the instrument create multitude possible applications of the system, especially for experiments where flow cytometry does not provide enough information about analyzed cells. The aim of this article is to introduce brief information about the system to scientists working with various systems of image

analysis or flow cytometry. The article summarizes basic information about the features of ImageStream system as well as its possible applications.

*Key words:* ImageStream, flow cytometry, digital image analysis, morphometry.

## WSTĘP

Podwaliną dla rozwoju i rozkwitu nauk biologicznych stało się skonstruowanie przez Hansa i Zachariaha Jannsenów pierwszego prototypu mikroskopu w 1590 roku. Ten prosty, jednosoczewkowy mikroskop został później udoskonalony i wprowadzony do użycia w XVII wieku przez Antona van Leeuwenhoekę pozwalając zaobserwować obiekty dotąd niedostrzegalne, odkrywając świat mikroorganizmów i komórek. Wraz z rozwojem nauk ścisłych i rozkwitem technologii, mikroskopia stała się podstawowym narzędziem biologów i lekarzy. Nowoczesna mikroskopia wyposażona w zdobycze technologii cyfrowej pozwala na jakościową oraz ilościową ocenę obiektów biologicznych, a także zachodzących w nich zjawisk. Ze względu na stosunkowo niewielką liczbę analizowanych obiektów selekcjonowanych przez badacza, pozostaje jednak nadal metodą w dużej mierze limitowaną w zakresie obiektywnej, ilościowej analizy [18, 33, 34, 64].

Kolejnym krokiem w rozwoju metod obrazowania i analizy komórek było skonstruowanie cytometru przepływowego, pozwalającego na analizę znacznie większej liczby obiektów w porównaniu z klasyczną mikroskopią. Idea cytometrii przepływowej zapoczątkowana została w 1934 roku przez Andrew Moldavana, ale dopiero w 1949 roku Wallace Coulter skonstruował pierwszy instrument zastosowany do liczenia komórek krwi w zawiesinie. Rozkwit cytometrii przepływowej postępował szybko, zwłaszcza w latach 1960–1970. Pierwszy funkcjonalny sorter komórkowy, zdolny do rozdziału populacji komórkowych przy wykorzystaniu ich właściwości optycznych, został wprowadzony w 1960 roku przez Leonarda i Leonorę Herzenberg z uniwersytetu w Stanford, ośrodka naukowego, który nadal pozostaje jednym z wiodących miejsc w rozwoju technologii cytometrycznej na świecie. Termin „cytometria przepływowa” – FC (ang. *flow cytometry*) został wprowadzony do słownika naukowego dopiero w 1976 roku, ale podobnie jak „sortowanie komórek na podstawie ich fluorescencji” – FACS (ang. *fluorescence activated cell sorting*) stał się powszechnie używany w dziedzinach stosujących obrazowanie komórkowe. Wprowadzenie cytometrii przepływowej przyczyniło się do poprawy obiektywizmu analizy i uzyskania oceny statystycznej populacji komórkowych.

Cytometria przepływowa pozwala na szybką analizę dużej liczby obiektów w stosunkowo krótkim czasie, uwzględniając relatywną ocenę wielkości komórek, ich ziarnistości (lub inaczej mówiąc stopnia skomplikowania ultrastruktury) oraz fluorescencji emitowanej przez te komórki. Zaletą tej metody jest możliwość szybkiej i obiektywnej analizy podstawowych i rzadkich populacji komórkowych oraz wieloparametrowa ocena komórek w tym samym czasie. W połączeniu z dostępem do ogromnej

liczby przeciwciał dla antygenów komórkowych oraz szerokim wachlarzem fluorochromów stosowanych dla ich znakowania, cytometria przepływowa znalazła szerokie zastosowanie w ocenie komórek na poziomie ich morfologii, funkcji oraz ekspresji genów, czego dowodem są tysiące publikacji naukowych z zastosowaniem tej metody [5, 14, 32, 43, 55, 56, 60]. Jednym z nielicznych mankamentów FC, zwłaszcza w zestawieniu z mikroskopią, jest brak rzeczywistego obrazowania analizowanych komórek. Analizowane obiekty, określane w cytometrii jako „zdarzenia” (ang. *events*) są wizualizowane na wykresach punktowych lub histogramach za pomocą parametrów bazujących na ich podstawowej morfologii i emitowanej fluorescencji. Rzeczywisty obraz obiektu, dobrze znany z mikroskopii, nie może być generowany przy zastosowaniu klasycznej cytometrii przepływowej i ocena morfometryczna skorelowana z właściwościami fluorescencyjnymi komórek nie może być przeprowadzona. Cytometr nie rozróżnia także obiektu komórkowego od artefaktu, jeżeli charakteryzują go podobne właściwości optyczne. W celu uzyskania dalszych informacji o klasycznej cytometrii przepływowej odsyłamy do wybranych pozycji literaturowych [7, 17, 29, 37, 66].

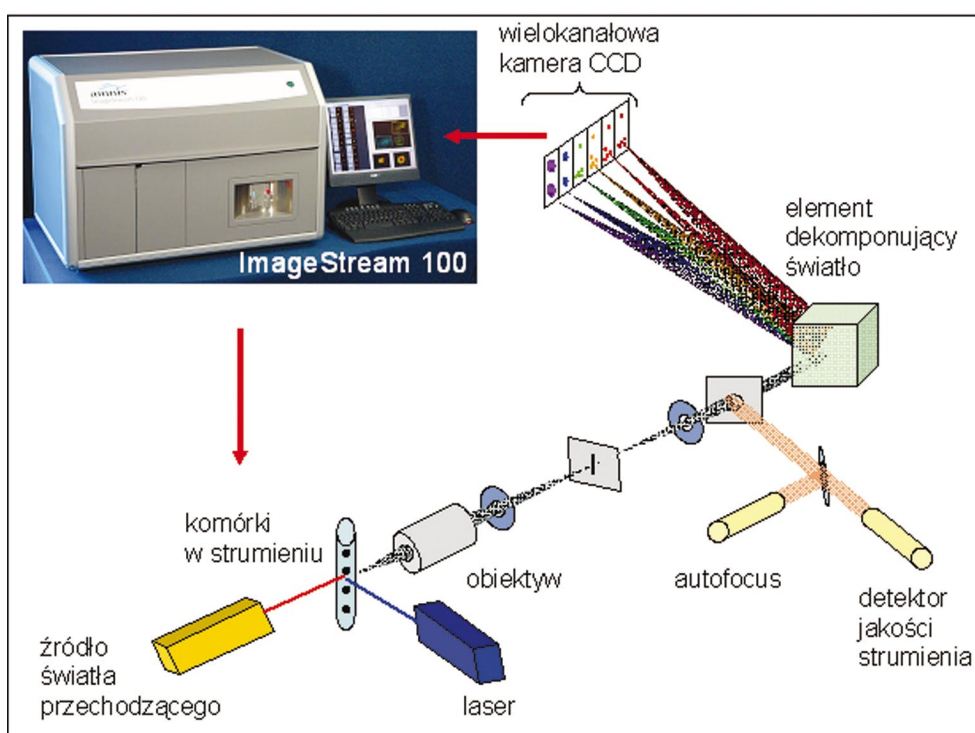
Pierwszym narzędziem mającym na celu połączenie cytometrii z nowoczesną mikroskopią i komputerową analizą obrazu był laserowy cytometr skanujący – LSC, (ang. *laser skanning cytometer*). Wspomniany system, podobnie jak cytometr przepływowy, umożliwia wieloparametrową ocenę stosunkowo dużej liczby komórek w krótkim czasie. Ocenie podlegają parametry optyczne komórek zbliżone do mierzonych za pomocą cytometru przepływowego. Podstawową różnicą metody LSC w porównaniu z klasyczną cytometrią przepływową jest to, że LSC ocenia komórki unieruchomione na szkiełku lub innym stałym nośniku. Metoda ta rozszerza możliwości cytometrii przepływowej korelując parametry fluorescencyjne z morfologią i topografią analizowanych komórek, poprzez wprowadzenie do analizy parametrów morfometrycznych badanych obiektów [8, 36, 63]. Brakiem metody LSC jest wciąż stosunkowo niewielka liczba analizowanych obiektów w porównaniu z cytometrią przepływową. W celu uzyskania dalszych, szczegółowych informacji na temat LSC odsyłamy do kompleksowych artykułów przeglądowych przygotowanych przez doświadczoną w tej technologii grupę profesora Darzyńkiewicza [11, 15, 35, 54].

Ostatnio do wspomnianych wyżej metod pomiaru i obrazowania komórek dołączyła technologia *ImageStream* (IS), której podstawowym narzędziem jest instrument łączący w sobie cechy cytometru przepływowego i mikroskopu fluorescencyjnego. W technologii tej można analizować komórki pozostające w zawiesinie i poruszające się w strumieniu cieczy, co zbliża ją pod względem zasady działania do klasycznego cytometru przepływowego. Podobieństwo polega także na tym, że system IS analizuje podobne jak cytometr przepływowy cechy optyczne komórek, które następnie mogą zostać przedstawione na wykresach punktowych lub histogramach i poddane analizie statystycznej w obrębie wybranych populacji komórkowych. Podstawową cechą, która czyni ten instrument bardziej zaawansowanym, jest możliwość uzyskania obrazu każdego analizowanego obiektu. Dzięki temu możliwe staje się skorelowanie parametrów fotometrycznych i morfometrycznych w obrębie analizowanej pojedynczej komórki. Pozwala to również na wizualizację obiektu przedstawionego na wykresie

punktowym za pomocą zdjęcia tego obiektu. Stosując klasyczną cytometrię przepływową badacz nie mógł wiedzieć do tej pory, co kryje się rzeczywiście pod „kropkami” pojawiającymi się na wykresie (ang. *dot-plot*), a przedstawiającymi analizowane obiekty. *ImageStream* pozwala przywołać zdjęcie tego obiektu, które może następnie zostać poddane dokładnej wieloparametrowej analizie obrazowej [22, 23, 27, 50, 52]. Nowe możliwości technologii *ImageStream* czynią ją atrakcyjną w kontekście nowych aplikacji badawczych.

## CHARAKTERYSTYKA SYSTEMU *IMAGESTREAM* (IS)

System *ImageStream* jest pierwszym komercyjnie dostępnym urządzeniem opracowanym przez *Amnis Corporation*, łączącym w pełni cechy cytometru przepływowego z możliwościami mikroskopu fluorescencyjnego oraz systemu komputerowej analizy



RYCINA 1. Elementy systemu *IMAGESTREAM*. Komórki poruszające się w zawiesinie, po wprowadzeniu do szklanej kувety, zostają zogniskowane w strumieniu, a następnie są oświetlane wiązką lasera (488 nm *solid-state laser*) wzbudzającą fluorescencję fluorochromów z nimi związanych. Światło przechodzące, rozproszone oraz emitowane przez komórki światło fluorescencyjne są zbierane przez obiektyw, a następnie dzięki układowi dekomponującemu rozdzielane na sześć niezależnych wiązek. Ostatecznie wiązki świetlne docierają do wielokanałowej kamery CCD, która stanowi detektor systemu. Informacja o obrazach analizowanych obiektów jest przekazywana do komputera i tam przechowywana do dalszej jej analizy w programie *IDEAS*

obrazu. Na rycinie 1 przedstawiono zasadnicze elementy systemu IS. Komórki pozostające w zawiesinie są wprowadzane do systemu hydrodynamicznego aparatu, gdzie są ogniskowane w laminarnym strumieniu, podobnie jak ma to miejsce w cytometrii przepływowej. Komórki są oświetlane prostopadłą wiązką lasera (488 nm *solid-state laser*) wzbudzającą fluorescencję fluorochromów z nimi związanych. Światło przechodzące (ang. *transmitted*), rozproszone (*scattered*) oraz emitowane przez komórki światło fluorescencyjne są zbierane przez obiektyw, a następnie, dzięki układowi zwierciadeł, rozdzielane na sześć niezależnych wiązek docierających ostatecznie do wielokanałowej kamery CCD, która stanowi detektor systemu [23]. Wysokiej klasy kamera zastępuje układ fotopowielaczy i fotodiod służący jako układ detektorów stosowany w klasycznych cytometrach przepływowych, zbierając sygnały świetlne i konwertując je na sygnały elektryczne generujące mapę pikseli obrazu (ryc. 1) [23, 59]. Właściwości obiektywu (0,75 NA) oraz rozdzielczość kamery (0,5  $\mu\text{m}$ /piksel) zapewnia stosunkowo wysoką rozdzielczość uzyskanego obrazu. Dzięki technice optycznej dekompozycji obrazu, *ImageStream* kolekcjonuje sześć niezależnych monochromatycznych podobrazów tej samej komórki. Należą do nich cztery obrazy fluorescencyjne (odpowiadające sygnałom fluorescencyjnym w wielokolorowej cytometrii przepływowej) oraz obrazy komórki w jasnym polu (*brightfield*) zależne od światła przechodzącego i w ciemnym polu (*darkfield*) zależne od światła rozproszonego. Zapewnia to możliwość niezależnej analizy sygnałów pochodzących od poszczególnych fluorochromów oraz rzeczywistego obrazu komórki, co z kolei daje możliwość lokalizacji tych sygnałów w konkretnych obszarach komórki, jak również ich wzajemną kolokalizację. Dzięki temu instrument staje się idealnym narzędziem do pomiaru rozmieszczenia różnych wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych molekuł, jak również ich translokacji w obrębie komórki. Jakość obrazu oraz opisany sposób jego zapisu daje możliwość analizy ponad 200 różnych fotometrycznych i morfometrycznych cech komórki oraz ich statystyczną analizę w obrębie wybranych populacji komórkowych [22, 23, 27, 50, 52]. Instrument w obecnym kształcie umożliwia użycie powszechnie stosowanych w cytometrii przepływowej fluorochromów, wzbudzanych światłem o długości fali lasera niebieskiego (488 nm). Cztery oddzielne kanały detekcji

TABELA 1. Wybrane fluorochromy i barwniki fluorescencyjne stosowane w technologii *ImageStream* (wzbudzone laserem o długości fali 488 nm)

Detekcja: Kanał 3 (500–560 nm)	Kanał 4 (560–595 nm)	Kanał 5 (595–660 nm)	Kanał 6 (660–735 nm)
FITC Alexa Fluor 488 eGFP eYFP YOYO-1 YOPRO-1 SYTO 16 SYTOX Green MitoTracker Green Fluo-3 Spectrum Green	PE Alexa Fluor 555 PKH26 Cy3 DSRed	PI 7-AAD R-PE-Alexa Fluor 610 PE-Texas Red QD-655	DRAQ5 PE-Cy5 PE-Cy5.5 PerCP PerCP-Cy5.5 (TruRed) R-PE-Alexa Fluor 647 R-PE-Alexa Fluor 680 QD-705

fluorescencji (kanały: 3 do 6) pozwalają zastosować cztery różne fluorochromy o różnym paśmie emisji w tym samym czasie (tab. 1). Aby zminimalizować efekt detekcji części emitowanej fluorescencji w detektorach innych niż właściwy dla danego barwnika, podobnie jak w przypadku analizy cytometrycznej, konieczne jest zastosowanie kompensacji pomiędzy stosowanymi fluorochromami w trakcie procesu analizy zapisanych obrazów [22, 50]. Kanały detekcji 1 i 2 zbierają odpowiednio światło rozproszone oraz przechodzące przez analizowane obiekty.

## PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA ZASTOSOWANIA TECHNOLOGII IS

*ImageStream* podobnie jak cytometr przepływowy analizuje komórki w zawiesinie. Przygotowanie materiału do analizy przy użyciu tego instrumentu jest zgodne z procedurami powszechnie stosowanymi w cytometrii przepływowej [57]. Komórki mogą zostać poddane analizie przyżyciowo lub po ich wcześniejszym utrwaleniu stosując standardowe utrwalcze stosowane w cytometrii oraz immunohistochemii (preferowane są roztwory paraformaldehydu) [4, 20, 23, 50, 52]. Barwienie antygenów powierzchniowych komórek powinno zostać przeprowadzone przed utrwaleniem komórek, przy zastosowaniu protokołów wypracowanych w cytometrii przepływowej [57]. W przypadku barwienia molekuł wewnątrzkomórkowych utrwalone komórki są dodatkowo permabilizowane przy użyciu roztworów Tritonu X-100, saponin lub metanolu [20, 50, 52]. W celu uwidocznienia jądra komórkowego używa się barwników wiążących się z DNA komórek, takich jak: jodek propidyny (PI), 7-aminoaktynomycyna D (7-AAD) oraz dihydroksyantrachinon (DRAQ5; ang. *dihydroxyanthraquinone*), zgodnie z dołączonymi do nich protokołami barwienia [3, 22, 23, 25, 47, 50, 52]. PI, jak również 7-AAD wnikają do komórek martwych lub wcześniej utrwalonych [26, 40, 65], natomiast DRAQ5 efektywnie barwi jądra zarówno komórek martwych, jak i żywych [44, 48, 71]. Typowy zestaw fluorochromów używanych dla celów analizy *ImageStream* został przedstawiony w tabeli 1. W każdym eksperymencie, oprócz kontroli, przygotowuje się próbki wybarwione tylko jednym fluorochromem, w celu kompensacji kolorów [24, 50]. Skompensowane obrazy komórek mogą być dalej poddane komputerowej analizie. Jej wynikiem jest jakościowa i ilościowa ocena wielu parametrów fotometrycznych i morfometrycznych komórek oraz ich wzajemna korelacja.

Technologia *ImageStream* została wprowadzona stosunkowo niedawno, ale liczba naukowców stosujących ją w swoich laboratoriach rośnie i lista potencjalnych jej zastosowań wydłuża się w szybkim tempie. Przykłady przedstawione poniżej należą do najlepiej opracowanych i opublikowanych badań z zastosowaniem IS [4, 9, 20, 22, 23, 27, 47, 52, 62].

### Ocena apoptozy komórek

Wiele metod pozwalających na ocenę apoptozy zostało opracowanych, odkąd proces ten został opisany przez Johna Kerra w 1972 roku [38]. Zmiany strukturalne



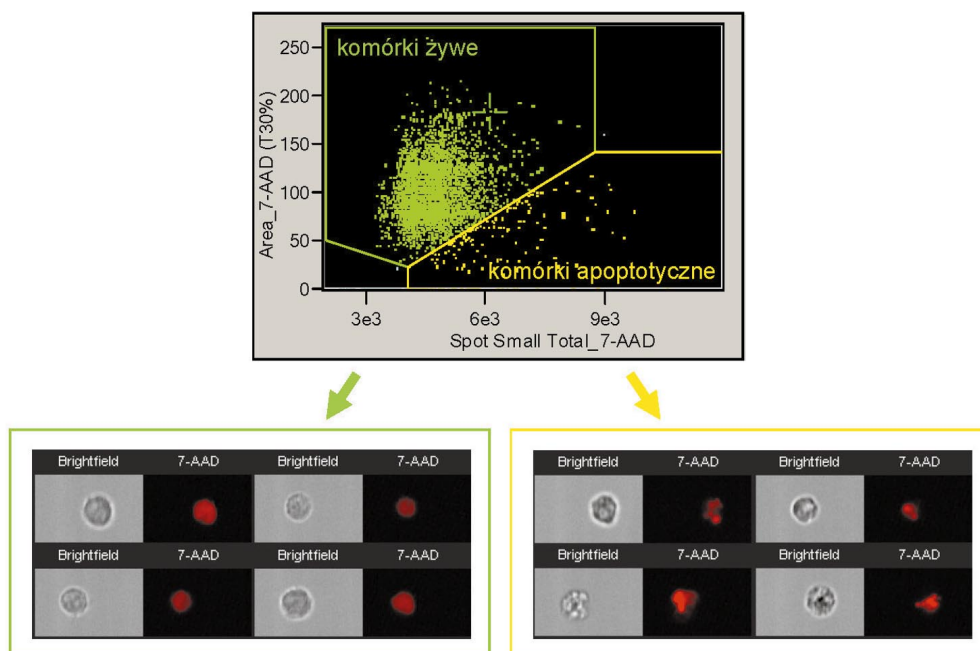
białek oraz DNA komórek apoptotycznych, utrata integralności organelli czy aktywacja enzymów odpowiedzialnych za apoptozę, mogą być oceniane za pomocą różnych metod detekcji, wykorzystujących m.in. PCR, elektroforezę, test ELISA, *Western blotting*, mikroskopię fluorescencyjną oraz cytometrię przepływową i LSC [6, 12, 13, 31, 41, 42, 45, 58, 67, 69]. Obecnie do wspomnianych metod doszła również technologia *ImageStream* bazująca na klasycznych technikach detekcji apoptozy opracowanych dla mikroskopii fluorescencyjnej i cytometrii. Rutynowo stosowany test z użyciem anneksyny-V (AnV) i jodku propidyny lub 7-AAD może być przeprowadzony z użyciem IS. Oprócz analizy statystycznej poszczególnych populacji (komórek żywych, martwych oraz wczesnych i późnych apoptotycznych) opartej na ocenie fluorescencji komórek pochodzącej od AnV i barwnika DNA, badacz otrzymuje dodatkowo między innymi informacje dotyczące struktury jądra komórkowego kluczowe dla opisu apoptozy, uzupełnione zdjęciami analizowanych komórek. Dzięki zestawieniu tych informacji możliwe staje się rozróżnienie komórek nekrotycznych wiążących AnV od późnych komórek apoptotycznych, co było do tej pory niemożliwe przy wykorzystaniu cytometru przepływowego. Dodatkowo analiza może być później zweryfikowana poprzez ocenę zdjęć każdej z populacji [21]. Użycie *ImageStream* pozwala także na detekcję apoptozy dzięki analizie tylko właściwości jądra komórkowego wybarwionego 7-AAD lub PI. Ze względu na analizę intensywności pikseli oraz ich rozmieszczenia na obrazie jądra komórkowego możliwa jest ocena kondensacji i fragmentacji chromatyny, pozwalająca na rozróżnienie komórek żywych od apoptotycznych [23]. Przykład takiej analizy przedstawiono na rycinie 2.

Odróżnianie artefaktów i rzeczywistych obiektów, dzięki wizualizacji analizowanych komórek jest jedną z mocnych stron tego systemu, której brakowało przy stosowaniu jak do tej pory powszechnemu cytometru przepływowemu. Dobrym tego przykładem jest zastosowanie technologii *ImageStream* do detekcji apoptozy techniką TUNEL (ang. *Terminal transferase dUTP Nick End Labeling*) [27]. Komórki wybarwione w tym teście normalnie ocenia się w mikroskopie fluorescencyjnym lub cytometrze przepływowym [30, 31, 51]. Zastosowanie IS pozwala na rozróżnienie prawdziwie TUNEL pozytywnych komórek apoptotycznych, od fałszywie pozytywnych z niespecyficznym związanym fragmentem TUNEL do ich powierzchni. Dla klasycznego cytometru przepływowego obie komórki są „pozytywne”. Warto nadmienić, że IS jednocześnie zapewnia statystyczną i graficzną analizę obiektów typową dla cytometrii przepływowej [27].

### Ocena translokacji wybranych molekuł

Technologia *ImageStream* znalazła także zastosowanie w ocenie translokacji różnych molekuł w obrębie komórki, wzbogacając inne tradycyjne metody, takie między innymi jak ocena mikroskopowa, LSC czy testy biochemiczne [15, 16, 39, 70]. *ImageStream* razem z laserową cytometrią skaningową mogą być z dużą skutecznością zastosowane do oceny np. translokacji czynników transkrypcyjnych z cytoplazmy do jądra komórkowego [15, 16, 19, 24].

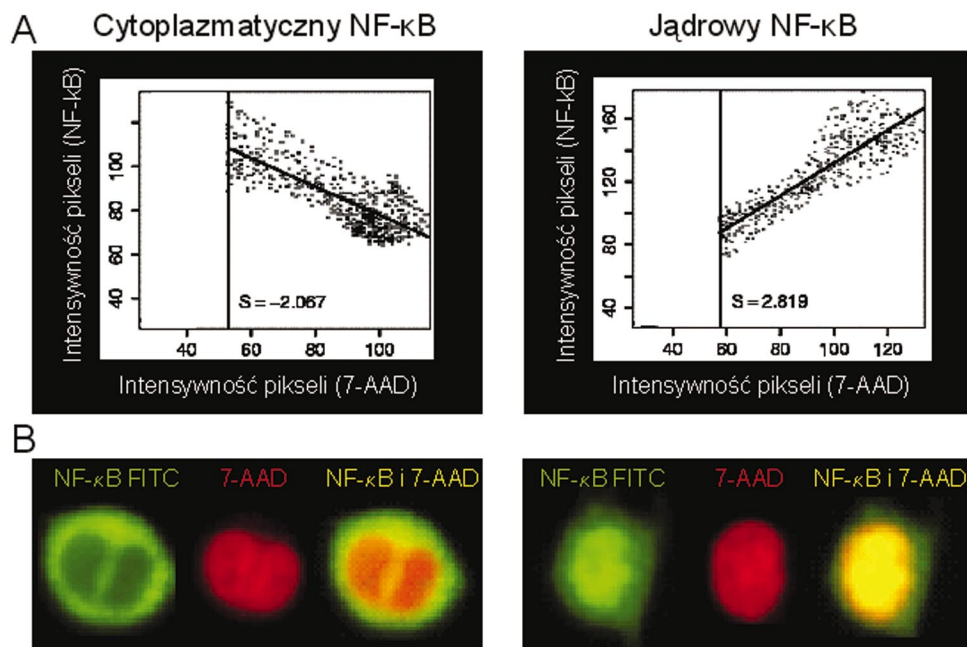
Ocena translokacji jest dokonywana poprzez porównanie obrazów jądra komórkowego (po wybarwieniu barwnikiem DNA) oraz obrazu wybarwionego czynnika



RYCINA 2. Przykład analizy apoptozy bazującej na fragmentacji jądra komórkowego. Żywe i apoptotyczne komórki linii Nalm-6 (ludzkiej białaczki typu B) rozróżniono na podstawie różnic w rozmiarze i intensywności fluorescencji jądra komórkowego (wybarwionego 7-AAD), a związanych z zachodzącą fragmentacją DNA. Komórki pobrane z gęstej hodowli, nietraktowane w celu indukcji apoptozy, utrwalono w 2% roztworze paraformaldehydu, wybarwiono 7-AAD (40  $\mu$ M), a następnie poddano analizie przez *ImageStream*. Komórki żywe i apoptotyczne przedstawiono na górnym dotplocie (odpowiednio region zielony i żółty). Przykładowe zdjęcia komórek, złożone z obrazu w jasnym polu (*brightfield*) oraz obrazu jądra komórkowego (kolor czerwony) przedstawiono poniżej. W porównaniu z komórkami prawidłowymi (lewy panel), jądra komórek apoptotycznych (prawy panel) są mniejsze, pofragmentowane i zawierają miejsca o wysokiej kondensacji chromatyny, co odzwierciedlają ich obrazy po wybarwieniu 7-AAD

transkrypcyjnego (ryc. 3). W trakcie analizy porównywana jest intensywność fluorescencji tego samego pikselu na dwóch obrazach (porównanie parami). Jeśli intensywności obu punktów korelują ze sobą pozytywnie, świadczy to o przemieszczeniu czynnika do jądra. W przeciwnym przypadku, gdy współczynnik korelacji jest ujemny, czynnik transkrypcyjny pozostaje w cytoplazmie. Wartości współczynników korelacji analizowanych komórek mogą zostać przedstawione w postaci histogramu wraz z analizą statystyczną w obrębie wyznaczonej populacji komórkowej. Dzięki temu możliwe jest również porównywanie stopnia translokacji pomiędzy różnymi populacjami lub próbkami. Poszczególne analizy mogą być następnie zweryfikowane poprzez przywołanie galerii zdjęć obiektów o dowolnym współczynniku korelacji [4, 19, 22, 24].



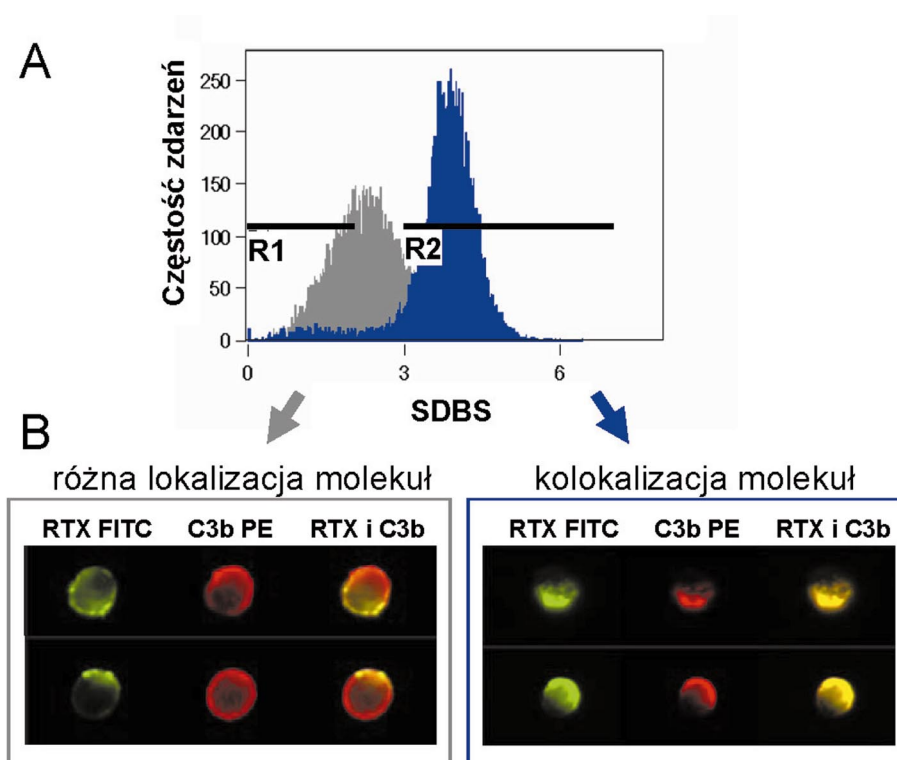


RYCINA 3. Przykład oceny translokacji czynników transkrypcyjnych do jądra komórkowego – parametr “similarity”. Rycina przedstawia przykład analizy translokacji NF-κB do jądra komórek linii THP-1 (ludzka linia monocytarna). Panel A przedstawia analizę komórek nietraktowanych (lewy dot-plot) oraz traktowanych LPS [100 ng/ml] (prawy dot-plot). Wykresy przedstawiają korelację intensywności fluorescencji pikseli budujących obraz w zakresie dwóch fluorescencji: 1) pochodzącej od wybarwionego czynnika NF-κB; 2) wybarwionego jądra komórkowego (7-AAD). Parametr S stanowi wartość podobieństwa (ang. *similarity score*) pomiędzy intensywnością tych samych pikseli na dwóch wymienionych obrazach i odzwierciedla translokację NF-κB do jądra lub jej brak. Przykładowe obrazy komórek (panel B) przedstawiają komórkę bez translokacji (lewy panel) i po translokacji NF-κB do jądra (prawy panel). Każde zdjęcie obejmuje obraz rozmieszczenia NF-κB (kolor zielony), obraz jądra komórkowego (kolor czerwony) oraz wspólny obraz obu fluorescencji

### Ocena kolokalizacji wybranych molekuł

Obrazy komórek uzyskanych w technologii *Image Stream* mogą zostać także poddane analizie pod kątem kolokalizacji wybranych molekuł w obrębie ich różnych obszarów komórkowych. Technika IS wzbogaca więc metody klasyczne, takie jak: testy koprecypitacji oraz klasyczną mikroskopię [10, 46, 49, 61, 68].

IS może być używany do analizy rozmieszczenia molekuł powierzchniowych, jak również wewnątrzkomórkowych, włączając molekuly charakterystyczne dla poszczególnych przedziałów wewnątrzkomórkowych [2, 20]. Stosując analizę zbliżoną do opisaną dla oceny translokacji, obliczany jest stopień podobieństwa pomiędzy



RYCINA 4. Przykład oceny kolokalizacji molekuł powierzchniowych. Przedstawiono ocenę kolokalizacji receptorów dla leku przeciwnowotworowego (Rituxan; RTX) oraz składnika dopełniacza (C3b) na komórkach linii Raji (ludzki chłoniak typu B). Komórki, wcześniej inkubowane z surowicą, wybarwiono przeciwciałem przeciw C3b (skoniugowanym z PE) oraz RTX (FITC). Histogram przedstawia wartości współczynnika podobieństwa punktów o intensywniej fluorescencji – SBDS (ang. *similarity bright detail score*) w komórkach o niskiej (szary kolor) i wysokiej (niebieski kolor) kolokalizacji obu molekuł. Regiony R1 i R2 bramkują odpowiednio komórki o najniższym i najwyższym SBDS (panel A). Panel B przedstawia przykładowe obrazy komórek z obu regionów. Każde zdjęcie komórki obejmuje obraz rozmieszczenia RTX (kolor zielony), obraz C3b (czerwony kolor) oraz wspólny obraz obu fluorescencji

obrazami rozmieszczenia dwóch różnych molekuł, zebranych w dwóch różnych kanałach, określany za pomocą „współczynnika podobieństwa punktów o intensywniej fluorescencji” – SBDS (ang. *Similarity Bright Detail Score*). Szczegółowy opis jego obliczania został zaproponowany przez Beuma [20]. Przykład oceny kolokalizacji receptorów powierzchniowych przy użyciu systemu *ImageStream* przedstawiono na rycinie 4.

Potencjalne zastosowanie IS do oceny kolokalizacji molekuł zyskuje coraz szersze zainteresowanie badaczy i wkrótce należy się spodziewać pierwszych przykładów prac z zastosowaniem tej techniki.

#### Inne zastosowania

Technologia *ImageStream* znalazła także inne, następujące zastosowania, takie jak:

- i) ocena zmiany kształtu komórki, formowania pseudopodii i migracji komórek [62];

- ii) identyfikacja i opis komórek o określonym profilu markerów [47, 52];
- iii) identyfikacja komórek wybarwionych metodą FISH [9];
- iv) identyfikacja komórek aktywnych mitotycznie [1, 25];
- v) identyfikacja synaps immunologicznych pomiędzy limfocytom T i komórką prezentującą antygen (APC) [28].

Lista potencjalnych zastosowań tej technologii stale się rozszerza, czego potwierdzenie wkrótce znajdziemy we wzroście publikacji wykorzystujących IS.

### **PORÓWNANIE TECHNOLOGII *IMAGESTREAM* (IS) Z CYTOMETRIĄ PRZEPŁYWOWĄ (FC) I LASEROWĄ CYTOMETRIĄ SKANINGOWĄ (LSC)**

System *ImageStream* (IS) znajduje swoje miejsce obok powszechnie już stosowanych cytometrii przepływowej (FC) i laserowej cytometrii skaningowej (LSC). IS, dysponując możliwością oceny nie tylko parametrów fluorescencyjnych, ale również cech morfometrycznych analizowanych obiektów, wykazuje podobieństwo do LSC [11, 54]. W przeciwieństwie jednak do LSC pozwala na analizę większej liczby obiektów oraz umożliwia pomiar komórek w zawiesinie, bez konieczności ich unieruchamiania, a więc z zachowaniem ich pierwotnej morfologii. Tego typu analiza jest szczególnie preferowana w badaniach tkanek, takich jak: krew, szpik kostny, a także komórek uwalnianych z tkanek stałych oraz komórek niektórych linii komórkowych. W porównaniu z cytometrią przepływową *ImageStream* dodaje do wieloparametrowej analizy statystycznej badanych populacji analizę zdjęć komórek. Zestawienie porównawcze wybranych cech wyżej wymienionych metod zamieszczono w tabeli 2.

### **PODSUMOWANIE**

Technologia *ImageStream* wprowadza nowe możliwości wieloparametrowej oceny komórek, łącząc w sobie cechy cytometru przepływowego i mikroskopu fluorescencyjnego współpracującego z nowoczesnym systemem analizy obrazu. System ten stwarza nowe możliwości zastosowania w wielu dziedzinach naukowych, jak również w działaniach klinicznych, a szczególnie w sytuacjach, w których cytometr przepływowy nie daje pełnej odpowiedzi co do charakterystyki analizowanych obiektów. Obecnie *Amnis Corporation* pracuje nad udoskonaleniem pierwszego wprowadzonego na rynek instrumentu poprzez dodanie dwóch dodatkowych laserów oraz elementów optycznych z nimi związanych, co sprawi, że jego możliwości w przyszłości znacznie się poszerzą.

Klasyczna cytometria przepływowa wykonała więc kolejny krok w XXI wiek.

TABELA 2. Porównanie systemu *ImageStream* (IS) z cytometrią przepływową (FC) i laserową cytometrią skaningową (LSC) [11, 53, 54]

Cecha	System <i>ImageStream</i> (IS)	Cytometr przepływowy (FC)	Laserowy cytometr skaningowy (LSC)
Przygotowanie materiału i pomiar	materiał w zawiesinie	materiał w zawiesinie	materiał unieruchomiony na szkiełku mikroskop., szklanej lub plastikowej płytce wielodołkowej, szalce Petriego
Szybkość pomiaru	do 300 komórek/s	do 70 000 komórek/s	do 100 komórek/s
Możliwość wielokrotnego pomiaru tego samego obiektu	nie	nie	tak
Wieloparametrowa korelacja fluorescencji z morfologią komórki	tak	nie	tak
Lokalizacja miejsc fluorescencji w komórce	tak	nie	tak
Lokalizacja miejsc w zależności od intensywności fluorescencji	tak	nie	tak
Ocena translokacji fluorochromów w obrębie komórki	tak	nie	tak
Możliwość sortowania komórek	nie	tak	nie
Lasery	Niebieski (488 nm) Czerwony (635 nm)* Fioletowy (405 nm)*	Niebieski (488 nm) Czerwony (635 nm)* Fioletowy (405 nm)*, inne	Niebieski (488 nm) Czerwony (635 nm)* Fioletowy (405 nm)*
Optyka	Do 4 detektorów fluorescencyjnych; Wymienne układy filtrów*	Do 17 detektorów fluorescencyjnych; Wymienne układy filtrów*	Do 4 detektorów fluorescencyjnych; Wymienne układy filtrów*

\* zostaną wprowadzone w najbliższej przyszłości

## PODZIĘKOWANIA

Autorzy składają podziękowania Filipowi Morrissey i Brianowi Hall (*Amnis Corporation, USA*) za krytyczne uwagi oraz dostarczenie materiałów potrzebnych do przygotowania pracy.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] AMNIS C. Analysis of Complement 3b deposition on Rituximab opsonized cells using ImageStream→ Multispectral Imaging Cytometry, [www.amnis.com](http://www.amnis.com), 2006.
- [2] AMNIS C. Analysis of Intracellular Molecular Trafficking using ImageStream→ Multispectral Imaging, [www.amnis.com](http://www.amnis.com), 2006.
- [3] AMNIS C: Quantitation of Apoptosis by Nuclear Fragmentation, [www.amnis.com](http://www.amnis.com), 2006.
- [4] ARECHIGA AF, BELL BD, SOLOMON JC, CHU IH, DUBOIS CL, HALL BE, GEORGE TC, CODER DM, WALSH CM. Cutting edge: FADD is not required for antigen receptor-mediated NF-kappaB activation. *J Immunol* 2005; **175**: 7800–7804.
- [5] ARORA SK. Analysis of intracellular cytokines using flow cytometry. *Methods Cell Sci* 2002; **24**: 37–40.
- [6] BARRETT KL, WILLINGHAM JM, GARVIN AJ, WILLINGHAM MC. Advances in cytochemical methods for detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 2001; **49**: 821–832.
- [7] BAUMGARTH N, ROEDERER M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods* 2000; **243**: 77–97.
- [8] BOWEN WP, WYLIE PG. Application of laser-scanning fluorescence microplate cytometry in high content screening. *Assay Drug Dev Technol* 2006; **4**: 209–221.
- [9] BRAWLEY J, GEORGE T, HALL B, JORGENSON R, FROST K, PERRY D, ZIMMERMAN C, SEO M, BASIJI D, ORTYN W, MORRISSEY P: Fluorescent *In Situ* Hybridization In Suspension Analysis Using ImageStream→ Multispectral Imaging Flow Cytometry. *ISAC XII*. 2004.
- [10] CHERRY RJ, MORRISON IE, KARAKIKES I, BARBER RE, SILKSTONE G, FERNANDEZ N. Measurements of associations of cell-surface receptors by single-particle fluorescence imaging. *Biochem Soc Trans* 2003; **31**: 1028–1031.
- [11] DARZYNKIEWICZ Z, BEDNER E, LI X, GORCZYCA W, MELAMED MR. Laser-Scanning Cytometry: A New Instrumentation with Many Applications. *Exp Cell Res* 1999; **249**: 1–12.
- [12] DARZYNKIEWICZ Z, HUANG X, OKAFUJI M. Detection of DNA strand breaks by flow and laser scanning cytometry in studies of apoptosis and cell proliferation (DNA replication). *Methods Mol Biol* 2006; 314.
- [13] DARZYNKIEWICZ Z, HUANG X, OKAFUJI M, KING MA. Cytometric methods to detect apoptosis. *Methods Cell Biol* 2004; **75**: 307–341.
- [14] DAVEY HM: Flow cytometric techniques for the detection of microorganisms. *Methods Cell Sci* 2002; **24**: 91–97.
- [15] DEPTALA A, BEDNER E, DARZYNKIEWICZ Z. Unique analytical capabilities of laser scanning cytometry (LSC) that complement flow cytometry. *Folia Histochem Cytobiol* 2001; **39**: 87–89.
- [16] DEPTALA A, BEDNER E, GORCZYCA W, DARZYNKIEWICZ Z. Activation of nuclear factor kappa B (NF-kappaB) assayed by laser scanning cytometry (LSC). *Cytometry* 1998; **33**: 376–382.
- [17] DRELA N: Wykrywanie wewnątrzkomórkowych cytokin metodą cytometrii przepływowej – zastosowanie i problemy. *Post Biol Kom* 2002; **28**: 129–146.



- [18] EGNER A, HELL SW. Fluorescence microscopy with super-resolved optical sections. *Trends Cell Biol* 2005; **15**: 207–215.
- [19] FANNING SL, GEORGE TC, FENG D, FELDMAN SB, MEGJUGORAC NJ, IZAGUIRRE AG, FITZGERALD-BOCARSLY P. Receptor Cross-Linking on Human Plasmacytoid Dendritic Cells Leads to the Regulation of IFN-Production. *J Immunol* 2006; **177**: 5829–5839.
- [20] GEORGE T, HALL B, TAYLOR R, BEUM P, CATHLEEN ZIMMERMAN C, DAVID BASIJI D, PHILIP MORRISSEY P, KEITH FROST K, WILLIAM ORTYN W. Assessment of Protein Co-localization with an Imaging Flow Cytometer and novel Analytical Method., *ISAC XXIII*. Quebec, Canada, 2006.
- [21] GEORGE T, HALL B, ZIMMERMAN C, FROST K, SEO M, PERRY D, ORTYN W, BASIJI D, MORRISSEY P. Distinguishing Modes of Cell Death Using ImageStream→ Multispectral Imaging Cytometry, 2004.
- [22] GEORGE T, HALL B, ZIMMERMAN C, FROST K, SEO M, PERRY D, ORTYN W, BASIJI D, MORRISSEY P. Quantitation of Nuclear Translocation Events using ImageStream Multispectral Imaging Cytometry, *ISAC XIII*, 2006;
- [23] GEORGE TC, BASIJI DA, LYNCH DH, ORTYN WE, PERRY DJ, SEO MJ, ZIMMERMAN CA, MORRISSEY PJ. Distinguishing Modes of Cell Death Using the ImageStream Multispectral Imaging Flow Cytometer. *Cytometry A* 2004; **59A**: 237–245.
- [24] GEORGE TC, FANNING SL, FITZGERALD-BOCARSLY P, MEDEIROS RB, HIGHFILL S, SHIMIZU Y, HALL BE, FROST K, BASIJI D, ORTYN WE, MORRISSEY PJ, LYNCH DH. Quantitative measurement of nuclear translocation events using similarity analysis of multispectral cellular images obtained in flow. *J Immunol Methods* 2006 Apr 20; 311(1–2):117–29 Epub 2006 Mar 10 2006; **311**:117–129.
- [25] GILLARD GO, FARR AG: Features of Medullary Thymic Epithelium Implicate Postnatal Development in Maintaining Epithelial Heterogeneity and Tissue-Restricted Antigen Expression. *J Immunol* 2006; **176**: 5815–5824.
- [26] GLISIC-MILOSAVLJEVIC S, WAUKAU J, JANA S, JAILWALA P, ROVENSKY J, GHOSH S. Comparison of apoptosis and mortality measurements in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using multiple methods. *Cell Prolif* 2005; **38**: 301–311.
- [27] HALL B, GEORGE T, BASIJI D, FROST K, ZIMMERMAN C, ORTYN W. Automated Classification of Apoptosis and Artifact Rejection of TUNEL Positive Cells. *ISAC XXIII*. Quebec, Canada, 2006.
- [28] HALL B, PERRY D, BRAWLEY J, GEORGE T, ZIMMERMAN C, FROST K, BASIJI D, SEO M, ORTYN W, MORRISSEY P. Multispectral High Content Cellular Analysis Using a Flow Based Imaging Cytometer: *ISAC XXII*. 2004.
- [29] HERZENBERG LA, DE ROSA SC. Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunobiology and medicine. *Immunol Today* 2000; **21**: 383–390.
- [30] HEWITSON TD, BISUCCI T, DARBY IA: Histochemical localization of apoptosis with *in situ* labeling of fragmented DNA. *Methods Mol Biol* 2006; **326**: 227–234.
- [31] HUNTER AL, CHOY JC, GRANVILLE DJ. Detection of apoptosis in cardiovascular diseases. *Methods Mol Med* 2005; **112**: 277–289.
- [32] JAROSZESKI MJ, RADCLIFF G. Fundamentals of flow cytometry. *Mol Biotechnol* 1999; **11**: 37–53.
- [33] JOHNSON LG: Applications of imaging techniques to studies of epithelial tight junctions. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; **57**: 111–121.
- [34] JONES CW, SMOLINSKI D, KEOGH A, KIRK TB, ZHENG MH. Confocal laser scanning microscopy in orthopaedic research. *Prog Histochem Cytochem* 2005; **40**: 1–71.
- [35] KAMENTSKY LA. Laser scanning cytometry. *Methods Cell Biol* 2001; **63**: 51–87.
- [36] KAMENTSKY LA, KAMENTSKY LD. Microscope-based multiparameter laser scanning cytometer yielding data comparable to flow cytometry data. *Cytometry* 1991; **12**: 381–387.
- [37] KAWIAK J. Cytometria przepływowa – badania immunocytometryczne. ed 2. Warszawa, Wydaw. Nauk. PWN, 1999.
- [38] KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; **26**: 239–257.
- [39] KIM J, KIM D, CHUNG J. Replication protein a 32 kDa subunit (RPA p32) binds the SH2 domain of STAT3 and regulates its transcriptional activity. *Cell Biol Int* 2000; **24**: 467–473.
- [40] KLEIN AB, WITONSKY SG, AHMED SA, HOLLADAY SD, GOGAL RMJ, LINK L, REILLY CM. Impact of different cell isolation techniques on lymphocyte viability and function. *J Immunoassay Immunochem* 2006; **27**: 61–76.
- [41] KOHLER C, ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immunol Methods* 2002; **256**: 97–110.
- [42] LOVBORG H, GULLBO J, LARSSON R. Screening for apoptosis – classical and emerging techniques. *Anticancer Drugs* 2005; **16**: 593–599.

- [43] MAFTAH A, HUET O, GALLET PF, RATINAUD MH: Flow cytometry's contribution to the measurement of cell functions. *Biol Cell* 1993; **78**: 85–93.
- [44] MARTIN RM, LEONHARDT H, CARDOSO MC. DNA labeling in living cells. *Cytometry A* 2005; **67**: 45–52.
- [45] MICOUD F, MANDRAND B, MALCUS-VOCANSON C. Comparison of several techniques for the detection of apoptotic astrocytes *in vitro*. *Cell Prolif* 2001; **34**: 99–113.
- [46] MIYASHITA T. Confocal microscopy for intracellular co-localization of proteins. *Methods Mol Biol* 2004; **261**: 399–410.
- [47] MORRISSEY P, GEORGE T, HALL B, ZIMMERMAN C, FROST K, BASIJI D, ORTYN W. Cell Classification in Human Peripheral Blood using the Amnis ImageStream→ Flow Imaging System.: *ASH* 2004.
- [48] NJOH KL, PATTERSON LH, ZLOH M, WILTSHIRE M, FISHER J, CHAPPELL S, AMEER-BEG S, BAI Y, MATTHEWS D, ERRINGTON RJ, SMITH PJ. Spectral analysis of the DNA targeting bisalkylaminoanthraquinone DRAQ5 in intact living cells. *Cytometry A* 2006; **69**: 805–814.
- [49] NOHE A, PETERSEN NO. Analyzing for co-localization of proteins at a cell membrane. *Curr Pharm Biotechnol* 2004; **5**: 213–220.
- [50] ORTYN WE, HALL BE, GEORGE TC, FROST K, BASIJI DA, PERRY DJ, ZIMMERMAN CA, CODER DC, MORRISSEY PJ. Sensitivity Measurement and Compensation in Spectral Imaging. *Cytometry A* 2006; **69A**: 852–862.
- [51] OTSUKI Y, LI Z, SHIBATA MA. Apoptotic detection methods – from morphology to gene. *Prog Histochem Cytochem* 2003; **38**: 275–339.
- [52] PARSONS CH, ADANG LA, OVERDEVEST J, O'CONNOR CM, TAYLOR JR. JR, CAMERINI D, KEDES DH. KSHV targets multiple leukocyte lineages during long-term productive infection in NOD/SCID mice. *J Clin Invest* 2006; **116**: 1963–1973.
- [53] PERFETTO SP, CHATTOPADHYAY PK, ROEDERER M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**: 648–655.
- [54] POZAROWSKI P, HOLDEN E, DARZYNKIEWICZ Z. Laser scanning cytometry: principles and applications. *Methods Mol Biol* 2006; **319**: 165–192.
- [55] RADCLIFF G, JAROSZESKI MJ. Basics of flow cytometry. *Methods Mol Biol* 1998; **91**: 1–24.
- [56] SHAPIRO HM. Multistation multiparameter flow cytometry: a critical review and rationale. *Cytometry* 1983; **3**: 227–243.
- [57] SHAPIRO HM. *Practical Flow Cytometry*. ed Fourth, John Wiley & Sons, Inc., 2005.
- [58] SOLDANI C, SCOVASSI AI, CANOSI U, BRAMUCCI E, ARDISSINO D, ARBUSTINI E. Multicolor fluorescence technique to detect apoptotic cells in advanced coronary atherosclerotic plaques. *Eur J Histochem* 2005; **49**: 47–52.
- [59] SPIBEY CA, JACKSON P, HERICK K. A unique charge-coupled device/xenon arc lamp based imaging system for the accurate detection and quantitation of multicolour fluorescence. *Electrophoresis* 2001; **22**: 829–836.
- [60] STEWART CC. Clinical applications of flow cytometry. Immunologic methods for measuring cell membrane and cytoplasmic antigens. *Cancer* 1992; **69**: 1543–1552.
- [61] SWICK L, KAPATOS G. A yeast 2-hybrid analysis of human GTP cyclohydrolase I protein interactions. *J Neurochem* 2006; **97**: 1447–1455.
- [62] TAN PC, MCNAGNY KM, HALL B. Quantitative Analysis of Pseudopod Formation With the ImageStream Cell Imaging System., Amnis Corp., www.amnis.com, 2006.
- [63] TARNOK A, GERSTNER AO. Clinical applications of laser scanning cytometry. *Cytometry* 2002; **50**: 133–143.
- [64] TORCHILIN VP. Fluorescence microscopy to follow the targeting of liposomes and micelles to cells and their intracellular fate. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; **57**: 95–109.
- [65] TOTINO PR, RICCIO EK, CORTE-REAL S, DANIEL-RIBEIRO CT, DE FATIMA FERREIRA-DA-CRUZ M. Dexamethasone has pro-apoptotic effects on non-activated fresh peripheral blood mononuclear cells. *Cell Biol Int* 2006; **30**: 133–137.
- [66] TUNG JW, PARKS DR, MOORE WA, HERZENBERG LA, HERZENBERG LA. New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data. *Clin Immunol* 2004; **110**: 277–283.
- [67] VERMES I, HAANEN C, REUTELINGSPERGER C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 2000; **243**: 167–190.
- [68] VOSS TC, DEMARCO IA, DAY RN. Quantitative imaging of protein interactions in the cell nucleus. *Biotechniques* 2005; **38**: 413–424.
- [69] YASUHARA S, ZHU Y, MATSUI T, TIPIRNENI N, YASUHARA Y, KANEKI M, ROSENZWEIG A, MARTYN JA. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 2003; **51**: 873–885.

- [70] YU Z, ZHANG W, KONE BC. Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) inhibits transcription of the inducible nitric oxide synthase gene by interacting with nuclear factor kappaB. *Biochem J* 2002; **367**: 97–105.
- [71] YUAN CM, DOUGLAS-NIKITIN VK, AHRENS KP, LUCHETTA GR, BRAYLAN RC, YANG L. DRAQ5-based DNA content analysis of hematolymphoid cell subpopulations discriminated by surface antigens and light scatter properties. *Cytometry B Clin Cytom* 2004; **58**: 47–52.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 20.04. 2007 r.*

*Przyjęto: 24.04. 2007 r.*

*University of Louisville, 580 S. Preston St., Baxter II, Rm. 128 Louisville, KY 40202*

*e-mail: ekzuba01@louisville.edu*