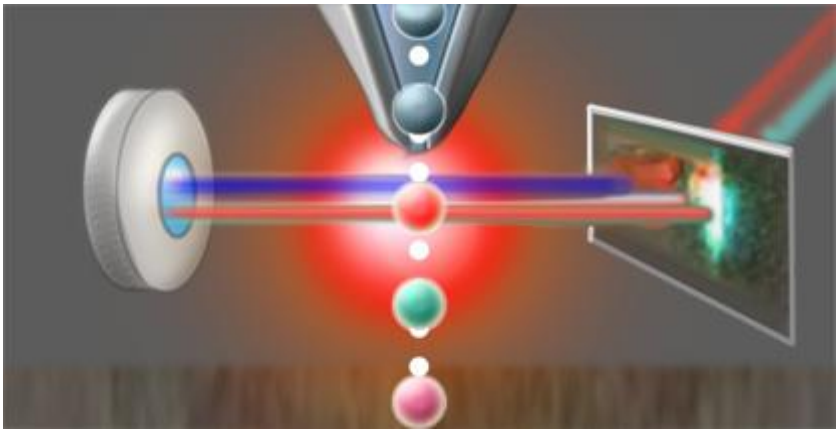
فن‌آوری فلوسایتومتری

علی اصغر صفری فرد، کارشناس ارشد خون شناسی و بانک خون

safarifardas@gmail.com



تصویر شماره یک

مقدمه

روش رایجی که بیشتر توسط محققین جهت تشخیص سلول‌های طبیعی و نئوپلاستیک بر روی لام فیکس شده صورت می‌گیرد، بر اساس ارزیابی‌های سیتولوژیکی و شکل ظاهری (مرفولوژی) آنها مبتنی است. متخصصین آسیب‌شناسی علی‌رغم تهیه رنگ‌های متنوع جهت رنگ‌آمیزی سلول‌های مختلف یک بافت، به سهولت و به سرعت قادر به شمارش انواع سلول‌های موجود در مقطع بافت مورد مطالعه نیستند و همچنین نمی‌توانند سلول‌هایی را که دارای منشأ اجدادی گوناگون و یا در مراحل مختلف تمایز هستند، تشخیص دهند. در طی سال‌های دهۀ ۶۰ میلادی تلاش جمعی از دانشمندان در زمینه‌های مختلف منجر به ابداع تکنیک فلوسایتومتری گردید، که این تکنیک در زمینه برطرف نمودن مشکلات فوق از توانایی‌های خاصی برخوردار است.

سیتومتری (**Cytometry**) یا یاخته سنجی به معنی تفکیک اجزاء سلولی متعدد در یک نمونه است. دستگاه فلوسایتومتری اجزاء متعدد سلولی را تعیین کرده و همزمان مورد شمارش قرار می‌دهد. خصلت‌هایی

که توسط فلوسایتومتری قابل اندازه‌گیری هستند، شامل اندازه سلول، پیچیدگی سیتوپلاسمی، محتوی **DNA** یا **RNA** سلول و طیف گسترده‌ای از پروتئین‌های داخل سلولی و یا متصل به غشاء می‌باشد.

در روش فلوسایتومتری سلول‌های رنگ‌آمیزی شده (چه به وسیله منوکلونال آنتی‌بادی متصل به فلورسنت و چه فلوروکروم‌های متصل شونده به اجزاء سلولی) در یک جریان سیال قرار گرفته و به صورت تک تک از مقابل پرتوی نوری (لیزر) عبور می‌کنند و متعاقب آن، نور پراکنده شده و نور فلورسانس جانبی توسط آشکارسازها جمع‌آوری می‌شوند. این آشکارسازها، سیگنال‌های نوری را به سیگنال‌های الکتریکی متناسب با نور جمع‌آوری شده تبدیل می‌کنند. پراکنش نور در زاویه‌های مختلف می‌تواند سلول‌ها را بر اساس تفاوت در اندازه و پیچیدگی درونی از هم متمایز کند، در حالی که ساطع شدن نور فلورسانس از آنتی‌بادی نشاندار شده با فلورسنت می‌تواند سلول‌ها را بر اساس تفاوت در آنتی‌ژن‌های سطحی و سیتوپلاسمی از هم تفکیک نماید. بدین ترتیب سلول‌ها بر اساس خصوصیاتی نظیر حجم، گرانولاسیون و میزان رنگ پذیری از هم افتراق داده می‌شوند.

در طول سالیان گذشته، ایمونوفنوتایپینگ توسط فلوسایتومتری، کمک بسیاری در تشخیص، طبقه بندی و پیگیری بعد از درمان سرطان‌های خون کرده است. امروزه اساس طبقه بندی بدخیمی‌های خون بر پایه خصوصیات طبیعی سلول‌های رده‌های مختلف در مراحل بلوغ می‌باشد. ایمونوفنوتایپینگ توسط فلوسایتومتری روشی سریع و آسان است. این روش با خصوصیت منحصر به فردی که دارد، سلول‌های مختلف را بر اساس آنالیز چند پارامتری تشخیص می‌دهد.

فلوسایتومتری نقش مهمی در زمینه‌های مختلف آسیب شناسی، هماتولوژی، ایمنی شناسی، بیماری‌های عفونی، بررسی پیوند اعضاء، نئوپلازیا و ژنتیک دارد و از طرفی بررسی وقایع چرخهٔ سلولی و نقایص موجود در **DNA** جهت تشخیص انواع لوکمی‌ها و لنفوم‌ها بوسیلهٔ فلوسیتومتری امکان پذیر است. همچنین این روش در تشخیص بیماری‌ها، تعیین پیش‌آگهی و هم برای ارزیابی درمان بدخیمی‌ها کاربرد دارد. فلوسایتومترهای کلینیکی معمولاً برای استفادهٔ آزمایشگاه‌های کلینیکی تنظیم شده است، اما بعضی از آنها ظرفیت جداسازی (**Sorting**) انتخابی سلول‌ها را دارا می‌باشند که در کارهای تحقیقاتی مورد استفاده هستند. پیشرفت‌های همزمان در وسایل و تجهیزات، تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال، رنگ‌های فلورسانس، کامپیوتر و نرم‌افزار، دریچهٔ جدیدی جهت استفاده از تکنیک فلوسایتومتری، در آزمایشگاه‌های کلینیکی گشوده است.

در فلوسایتومتری مدرن، مجموعه‌ای از فن‌آوری‌های گوناگون برای سنجش سلول‌ها و بررسی ساختمان و محتوای درونی آنها بکار گرفته شده است. در این روش حتی ذرات کوچکتر از ۰/۱ میکرومتری قابل تشخیص بوده و آستانه رنگ سنجی آن حدود ۱۰۰۰ مولکول رنگ یا ۱×۱۰^{-۱۸} گرم رنگ به ازای هر سلول است. بدین مفهوم که اگر یک گرم رنگ در حجمی به ابعاد **۳۰۰m** × **۳۰۰۰ Km** × **۳۰۰۰Km** حل شود، دستگاه قادر به تشخیص آن می‌باشد.

کاربردهای فلوسایتومتری

به طور کلی کاربرد پزشکی فلوسایتومتری را می‌توان در چهار مورد خلاصه کرد:

- تشخیص و طبقه بندی سرطان‌های خون (توانایی تشخیص دقیق جمعیت‌های سلولی غیرطبیعی همراه با تعیین رده و میزان بلوغ سلول‌ها)
- سنجش فاکتورهای بیولوژیکی و حضور بعضی مولکول‌های اختصاصی که در تعیین پیش‌آگهی بیماری نقش دارند.
- شناسایی آنتی‌ژن‌هایی که به عنوان هدف‌های درمانی استفاده می‌شود. (استفاده از آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن‌های خاص که سلول بدخیم آن را بیان می‌کند).
- شناسایی سلول‌های باقی مانده بدخیم در طول درمان که در تعیین پاسخ به درمان و احتمال عود بیماری بسیار مهم هستند.

مزایای سیستم فلوسایتومتری بر سایر روش‌های اندازه‌گیری فلوروسانس

۱- عینی بودن **Objective**

۲- حساسیت بالا (دستگاه می‌تواند تا بیش از هزار مولکول فلوئوروکروم را در سلول مشخص کند)

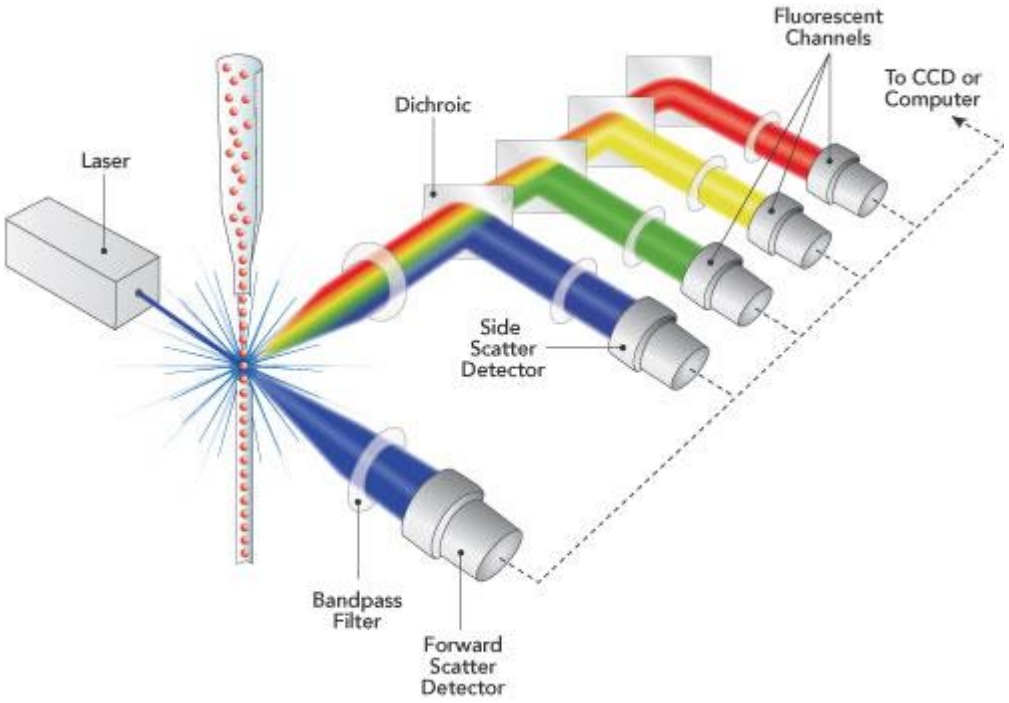
۳- سرعت عمل زیاد که بررسی تعداد زیادی سلول را ممکن می‌سازد (۱×۱۰^{۵} سلول در هر دقیقه)

۴- توانایی تشخیص سلول‌های نادر با مشخصات اختصاصی در یک جمعیت هتروژن و ناهمگن

۵- توانایی مطالعهٔ سلول‌های زندهٔ فیکس نشده

۶- توانایی اندازه‌گیری معیارهای همزمان چندین پارامتر و تطابق چند حساسیت هر سلول معلق در مایع

اصول



تصویر شماره دو

تکنولوژی فلوسایتومتری بر اساس خصوصیات فیزیکی و شیمیایی سلول‌ها یا دیگر ذرات می‌باشد، هنگامی که این سلول‌ها یا ذرات از مقابل یک سیستم آشکارسازی نوری **Photo Detector** عبور می‌کنند، ارزیابی می‌گردند. از آن جایی که هر سلول وقتی از جلو سیستم گذر می‌نماید، به تنهایی اندازه‌گیری و آنالیز می‌شود و همچنین به سبب این که اندازه‌گیری‌های متعدد و مختلف در زمان واحد انجام می‌شود، بنابراین پارامترهای مختلف چند هزار سلول در طول مدت زمانی بسیار کوتاهی محاسبه می‌گردد. بطور کلی اینکه، دستگاه فلوسایتومتری به نحوی طراحی شده است که قادر است تعداد زیادی سلول و ذرات بیولوژیکی مانند هسته‌های جدا شدهٔ سلولی، کروموزوم‌ها و میکروارگانیسم‌ها را در محیط مایع با استفاده از اشعهٔ لیزر، آنالیز نموده و خواص فیزیکی آنها مانند اندازه نسبی و میزان گرانولیتی سیتوپلاسم را مشخص نماید. باید دانست که فلوسایتومتری قادر است تعداد ۱ سلول سرطانی در میان ۱۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ سلول عادی موجود در نمونهٔ مغز استخوان را شناسایی کند.

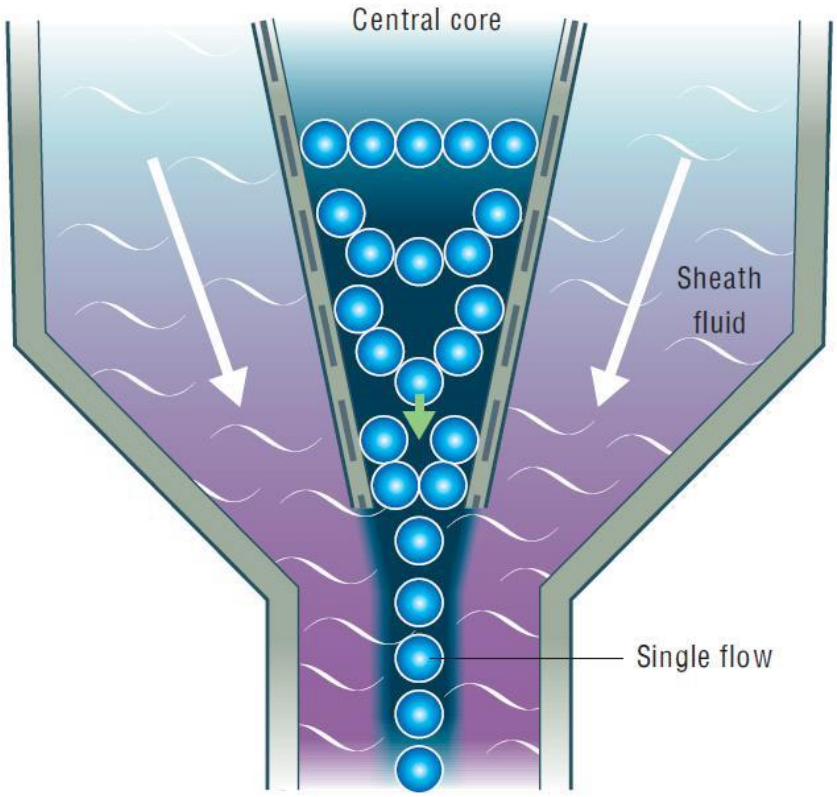
در اثر تابش اشعهٔ لیزر به سلول‌ها و برحسب اندازه و ساختمان داخلی آنها، سیگنال‌های نوری حاصل می‌شود که بوسیلهٔ تقویت‌کننده‌های نوری **PMT = Photo Multiplier Tube** دستگاه به سیگنال الکتریکی تبدیل می‌گردد و پس از آنالیز بوسیلهٔ کامپیوتر به شکل نمودار نمایش داده می‌شود. چنانچه سلول‌ها به وسیلهٔ رنگ‌های اختصاصی **DNA** و **RNA**، پروتئین، شاخص‌های سطح سلول‌ها و اجزای درون سلولی رنگ‌آمیزی شده باشند، در اثر تابش اشعهٔ لیزر، فلوروکروم متصل به آنها تحریک شده و در برگشت به حالت پایدار اولیه، سیگنال‌های فلوئورسنت خاص با طول موج جذبی مخصوص خود ایجاد می‌نماید. این سیگنال فوتون نوری، دارای طول موج بالایی بوده و انرژی تابشی دارد که مختص رنگ آن است. سیگنال‌های فوق نیز به سیگنال‌های

الکتریکی تبدیل گردیده و در نتیجه کلیهٔ مشخصات سلولی، اعم از گرانولیتی، ساختمان درون سیتوپلاسم و شاخص‌های مورد نظر سطحی سلول به طور همزمان بصورت نمودار گزارش می‌شوند.

آماده سازی نمونه

برای انجام هر نوع فلوسایتومتری ابتدا باید سلول‌ها را آماده کرد، به طوری که سلول‌ها به صورت تکی درآمده و در محیط مناسبی معلق شده باشند. بعضاً یک مرحله تخلیص برای بالا بردن غلظت سلول‌های مورد نظر در نمونه ضرورت پیدا می‌کند. روش‌های مختلفی برای تهیه، تخلیص و آماده سازی سلول وجود دارند و روش انتخاب شده به نوع سلول مورد ارزیابی بستگی دارد. پس از تهیه سوسپانسیون مناسب، سلول‌ها باید با مواد فلورسانس رنگ شوند و یا با آنتی‌بادی‌های کونژوگه با فلوروکروم نشاندار شوند. روش نشاندار کردن تحت تأثیر فاکتورهای زیادی مانند میزان اختصاصی بودن آنتی‌بادی و غلظت آنتی‌ژن در سطح یا داخل سلول، مناسب بودن غلظت آنتی‌بادی مورد استفاده و بکار بردن کنترل‌های مثبت و منفی مناسب در آنالیز سلول‌ها قرار می‌گیرد.

تمرکز هیدرودینامیک Hydrodinamic Focousing



تصویر شماره سه

خصوصیت اصلی یک سیستم فلوسایتومتری این است که اندازه‌گیری‌ها بر روی نمونه‌های سلولی که در دستگاه جریان می‌یابند، انجام می‌شود. اگر از یک لوله جهت انتقال نمونه استفاده شود، سلول‌ها نمی‌توانند به طور مکرر به نقطه اندازه‌گیری (محل برخورد لیزر به سلول) بروند. اگر از لوله‌های باریک جهت اطمینان از انتقال تکرار پذیر سلول‌ها استفاده شود، احتمال دارد با عبور سلول‌های بزرگتر مسیر بسته شود. برای حل این مشکل از روش " تمرکز هیدرودینامیک **Hydrodinamic Focousing**" کمک گرفته می‌شود. در این روش جریان آرامی از سلول‌ها را به درون جریان حامل سریع (**Sheath fluid**) وارد می‌کنند. مایع حامل، سلول‌ها را در مرکز لوله متمرکز می‌کند، بنابراین سلول‌ها به طور منظم و در یک مسیر مجازی به نقطه اندازه‌گیری منتقل می‌شوند.

هدف از آماده سازی نمونه، تهیهٔ یک سوسپانسیون از پارتیکل‌های منفرد است که به روش خاصی رنگ‌آمیزی شده‌اند تا در سیستم، بدون ایجاد اختلال در جریان یکنواخت مایع (سیال) و یا انسداد لوله و منافذ دستگاه عبور کنند. در سیستم فلوسایتومتری، سلول‌های معلق در مایع ایزوتونیک از طریق سیستم حسی با فشار هوا از ظرف حاوی نمونه به لولهٔ مخصوصی منتقل شده و به یک محفظهٔ خاصی به نام «حفرهٔ جریان» **Flow chamber** وارد می‌شوند، مایع پوششی **Sheath fluid** در حفرهٔ نمونه، یک اثر تمرکز هیدرودینامیکی ایجاد کرده و نمونه را به داخل جریان می‌کشاند که زیادتر بودن سرعت جریان مایع پوششی نسبت به مایع حاوی نمونه، سبب هدایت سلول‌ها به صورت منفرد (تک‌تک) جهت عبور از سوراخ انتهایی می‌شود تا در نقطهٔ خاصی در مقابل اشعهٔ لیزر قرار بگیرد. سلول از لوله شیشه‌ای با سرعتی حدود ۵ تا ۵۰ متر در ثانیه از میان منفذی باریک و از مقابل پرتوی یک یا چند منبع نوری که غالباً لیزر است، عبور می‌کنند. بدین ترتیب امکان جمع‌آوری اطلاعات مربوط به ۵۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰ سلول در هر ثانیه فراهم می‌شود.

فلورسانس

فلوسایتومتری بر خصوصیات پراکنده سازی نور توسط سلول‌ها و نیز بر نشر فلورسانس از آنها استوار است. نشر فلورسانس با استفاده مستقیم از مواد رنگ کننده فلورسنت حاصل می‌شود (در این روش که مستقل از آنتی‌بادی است، غالباً از فلوکروم‌های متصل شونده به **DNA** ، **RNA** و یا دیگر اجزای سلولی استفاده می‌شود) یا ترکیبی از رنگ فلورسنت با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال که تحت نام عمومی کونژوگه مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این حالت انتخاب محل اتصال به سلول، توسط جزء آنتی‌بادی موجود در کونژوگه صورت می‌گیرد و این آنتی‌بادی است که به صورت کاملاً اختصاصی، آنتی‌ژن هدف را بر روی سلول یا در داخل آن شناسایی کرده و به آن متصل می‌شود و جزء فلورسنت موجود در کونژوگه ابزاری برای ردیابی محل و میزان آنتی‌بادی‌های متصل شده به هدف می‌باشد.

سیستم نوری

سیستم نوری فلوسایتومتر متشکل از یک یا چند منبع نوری به همراه یک سری از عدسی‌ها، فیلترها و آشکارسازها است. عدسی‌ها و فیلترها جهت انتقال نور منبع به نقطه اندازه‌گیری و نیز برای انتقال نور پراکنده و فلورسانس از نقطه اندازه‌گیری به آشکارسازها به کار می‌روند.

الف) منبع نور:

انواع مختلفی از منابع نوری برای فلوسایتومتر وجود دارند. در فلوسایتومترهای مدرن، نور لیزر به عنوان منبع نوری بکار می‌رود، لیزر نسبت به جیوه یا لامپ‌های دیگر مزایایی دارد که از آن جمله می‌توان به تولید نور منوکروم (تک رنگ) و با اندازهٔ نقطه‌ای بسیار کوچک آن اشاره کرد، این اندازهٔ نقطه‌ای بسیار مهم است، زیرا هرچه نور در فضای کوچک‌تری محدود شود، میزان تهییج سلول به حد ماکزیمم نزدیکتر می‌شود، علاوه بر این باعث اطمینان از قرار گرفتن تنها یک سلول در برابر نور در هر لحظه می‌گردد. بیشترین لیزر مصرفی نیز، لیزر آرگون با طول موج ۴۸۸ نانومتر می‌باشد که با هوا سرد می‌شود، ارزان‌تر هم بوده و قابل دسترس‌تر است. لیزرهای دیودی نیز به دلیل پایداری و قیمت ارزان مورد استفاده قرار می‌گیرند و معمولاً طول موج (ششصد و سی و پنج) نانومتر آن مورد استفاده است.

ب) فیلترها:

سیستم نوری فلوسایتومتر، سیگنال‌های فلوئورسانس ساطع شده از سلول‌ها را به یک سیستم الکترونیکی هدایت می‌کند، این سیستم از یک سری فیلترهای مخصوص جذب نور و آینه‌های **Dichoric** یا دو رنگ نما تشکیل شده است. فیلترهای نوری، فقط طول موج خاصی را عبور داده و مانع عبور سایر طول موج‌ها می‌شوند. فیلترهای دو رنگ نما، آینه‌های انتخابی هستند که اجازه عبور طول موج‌های بلند را می‌دهند و طول موج‌های کوتاه را منعکس می‌کنند. فیلتر باند عبوری جهت عبور باند باریکی از طول موج بین ۶۴۰ - ۶۲۰ نانومتر طراحی شده است. فیلترهای جذب نور در زاویهٔ 90^{o} نسبت به مسیر تابش اشعهٔ لیزر قرار گرفته‌اند و آینه‌های **Dichoric** نسبت به فیلترها در زاویهٔ 45^{O} قرار دارند. علاوه بر این دتکتورهای خاصی به منظور دریافت سیگنال‌های حاصل از اندازهٔ سلول و گرانولیتی در این سیســـــــتم وجود دارند که اصطلاحاً **Fs sensor** و **SS sensor** نامیده می‌شوند. به مجرد عبور یک سلول از مقابل اشعهٔ لیزر، چندین پارامتر فیزیکی و فلوئورسانس آن، بطور همزمان اندازه‌گیری می‌شود.

ج) آشکارسازها:

با عبور ذرات یا سلول‌ها از مقابل پرتو لیزری، مولکول‌های فلورسانس سطح سلول، فوتون‌هایی با طول موج خاص در همه جهات تابش می‌کنند. سیستم اپتیکی بخشی از این فوتون‌ها را به آشکارسازها (**Detector**) می‌رسانند. فوتودیودها (**PD**) و فوتومولتی تیوب‌ها (**PMT**) به خاطر حساسیت بالای آن‌ها به عنوان آشکارساز

استفاده می‌شوند. ابتدا فوتون‌های رسیده از نمونه توسط آشکارسازها به فوتوالکترون تبدیل شده و سپس جریان الکتریکی آن به ولتاژ تبدیل می‌شود. به دلیل اینکه سیستم الکترونیکی، ولتاژ را اندازه‌گیری و مقایسه می‌کند، باید خروجی آشکارساز به ولتاژ تبدیل گردد. تبدیل جریان به ولتاژ با عبور جریان یا شار الکتریکی از یک مقاومت انجام می‌گیرد. آن چه اتفاق می‌افتد بر اساس قانون اهم قابل پیش‌بینی است. ولتاژ تولید شده برابر حاصل ضرب جریان در مقاومت است و چون مقدار مقاومت ثابت است ولتاژ خروجی مستقیماً متناسب با جریان ورودی است. مدار الکترونیکی که این تبدیل را انجام می‌دهد،"تقویت کننده **Trans-impedence**" نام دارد که می‌تواند در مدار بخش **PMT** جاسازی شود. این مدار جریان فوتو الکترون‌ها را به ولتاژ تبدیل کرده و تقویت خطی ولتاژ را فراهم می‌کند.

پراکنش

اگر چه سلول‌ها به خودی خود دارای فلورسانس اندکی در برخی طول موج‌ها هستند اما بدون بکارگیری نور تهییج کننده (لیزر) هیچ سیگنالی تولید و به ردیاب‌های دستگاه ارسال نخواهد شد. پس از برخورد نور لیزر به سلول‌ها، بازتاب نور لیزر در جهات مختلف پراکنده شده و توسط ردیاب‌هایی که در زوایای مختلف قرار دارند، برای کسب اطلاعات جمع‌آوری می‌شود.

در صورتی که سلول به صورت یک کرهٔ همگن و یکنواخت باشد، در اثر تابش لیزر، نور تحت زاویهٔ **360º** توسط سلول پراکنده و بوسیلهٔ آشکارساز مستقیم **Fs sensor** که در زاویهٔ **2-20 º** نسبت به محور تابش لیزر قرار دارد، دریافت و اندازه‌گیری می‌شود، این نور اصطلاحاً **FALS** نامیده می‌شود و مقدار آن رابطهٔ مستقیم با اندازهٔ سلول دارد. به عبارت دیگر نوری که در جهت مستقیم پراکنده می‌شود (**Forward**) متناسب با سایز سلول یا ذره است.

مقدار نوری که تحت زاویهٔ **90 º** نسبت به محور تابش لیزر از سلول پراکنده می‌شود. اصطلاحاً نور **SS** نامیده می‌شود و مقدار آن بستگی به خصوصیات شکست نور توسط سلول، اجزای درونی، میزان گرانولیتی سیتوپلاسم، ساختمان هسته و سطح سلول (ناهمواری غشاء) دارد. برای مثال یک گلبول قرمز رسیده با سیتوپلاسم همگن، بدون هسته و اندامک‌های سیتوپلاسمی، نسبت به یک یاخته ائوزینوفیل که حاوی گرانول‌های سیتوپلاسمی زیاد و هستهٔ مرکب از چند قطعه است، تفرق نوری **90 º** بسیار کمتری دارد. سیگنال پراکنش نوری **90º**، توسط آشکارساز قائمه دریافت می‌شود و به سیگنال دیجیتالی تبدیل می‌گردد.

از نظر میزان نور **SS**، لنفوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها به ترتیب از کم به زیاد قرار دارند. به این ترتیب موازین **FALS** و **SS** می‌تواند برای مشخص کردن تیپ هر کدام از سلول‌ها بکار رود و رابطهٔ آن بدین شرح است:

گلبول‌های قرمز و نخاله‌های سلولی < لنفوسیت < منوسیت < گلبول‌های سفید چند هسته‌ای

انتشار فلوئورسانس

علاوه بر این اگر مولکول‌های فلورسنت و یا فلوروکروم‌ها به سلول‌ها متصل شده باشند، توسط نور تابیده تهییج شده و بازتابی حاصل می‌شود که سایر ردیاب‌ها و فیلترهای نوری آن را جذب می‌کنند. مولکول‌های فلورسنت می‌توانند متصل شده به آنتی‌بادی‌ها، رنگ‌های حساس به **Ca++** و متصل شده به اجزای سلولی، مولکول‌های فلورسنتی که توسط سلول بروز داده می‌شوند و رنگ‌های متصل شونده به **DNA** باشند. نتیجه دقیق، بررسی چند پارامتری هر ذره یا سلول است و تعداد پارامترهای بررسی شده بستگی به تعداد مولکول‌های فلورسنتی دارد مورد استفاده قرار گرفته است.

آشکارساز فلورسانس، امواج فلورسانس منتشره از برخورد نور لیزر به فلوروکروم‌های متصل به سلول را دریافت می‌کند. این آشکارساز در زاویه **90^{o}** نسبت به منبع نوری یعنی روبروی آشکارساز قائمه قرار می‌گیرد. در صورت مطالعه همزمان چند فلوروکروم که به اجزاء مختلف سلولی متصل شده‌اند، می‌توانیم از چندین آشکارساز فلورسانس استفاده کنیم.

بر اساس پارامترهای تفرق نوری (**FALS** و **SS**) می‌توان **gate**های الکترونیکی (محدوده‌ها) بدور دسته‌جات سلولی مورد نظر برای تجزیه با فلورسنت کشید، آنگاه فلوئورسانس سلول‌ها در نمونه می‌تواند بطور انتخابی تعیین شود و بصورت توزیع کثرت ترسیم گردد. کلیه اطلاعات توسط یک کامپیوتر که در یک سیستم گنجانیده شده است، جمع‌آوری، محاسبه و ذخیره می‌گردد.

غالباً حجم مورد نیاز از نمونه موردآزمایش نیز خیلی کم و حدود ۱۰۰ میکرولیتر می‌باشد. بررسی فلوسایتومتریک هرچه زودتر باید انجام شود (پس از نمونه‌گیری)، بهرحال نمونه‌ها را می‌شود برای ۲۴ ساعت در دمای اتاق (مخصوص خون کامل) و یا **4^{oc}** (مخصوص سلول‌های منونوکلئر جدا شده) نگهداری نمود و سپس ایمونوفنوتایپینگ انجام داد. در هنگامی که نمونه‌ها برای بیشتر از ۲۴ ساعت نگهداری می‌شوند، اضافه کردن محیط کشت سلولی، مانند **RPMI** ضروری است.

فلوروکروم‌ها

برای انجام فلوسایتومتری لازم است که ابتدا سلول‌ها با فلوروکروم‌ها نشاندار شوند. از طرفی برای نشاندار کردن اجزاء داخلی سلول باید اقدامات خاصی را انجام داد تا آنها در دسترس آنتی‌بادی یا ماده فلورسنت قرار گیرند. تعداد فلوروکروم‌های مورد استفاده برای فلوسایتومتری در طی سالیان متمادی مرتباً افزایش یافته است و این احتمال وجود دارد که در آینده، تعداد فلوروکروم‌های مورد استفاده برای آنالیز سلول‌ها بیش از این نیز افزایش یابد. شناخت انواع فلوروکروم‌ها و آگاهی از مزیت‌ها و معایب هر کدام تنها راه استفاده بهینه از آنها برای دستیابی به مقاصد علمی تحقیقاتی است. امروزه پرمصرف‌ترین رنگ‌های فلوئورسان متصل به آنتی‌بادی‌ها در فلوسایتومتری بالینی، فلوئورسین ایزوتیوسیانات **(FITC)** و فیکواریترین **(PE)** می‌باشند. تمامی این

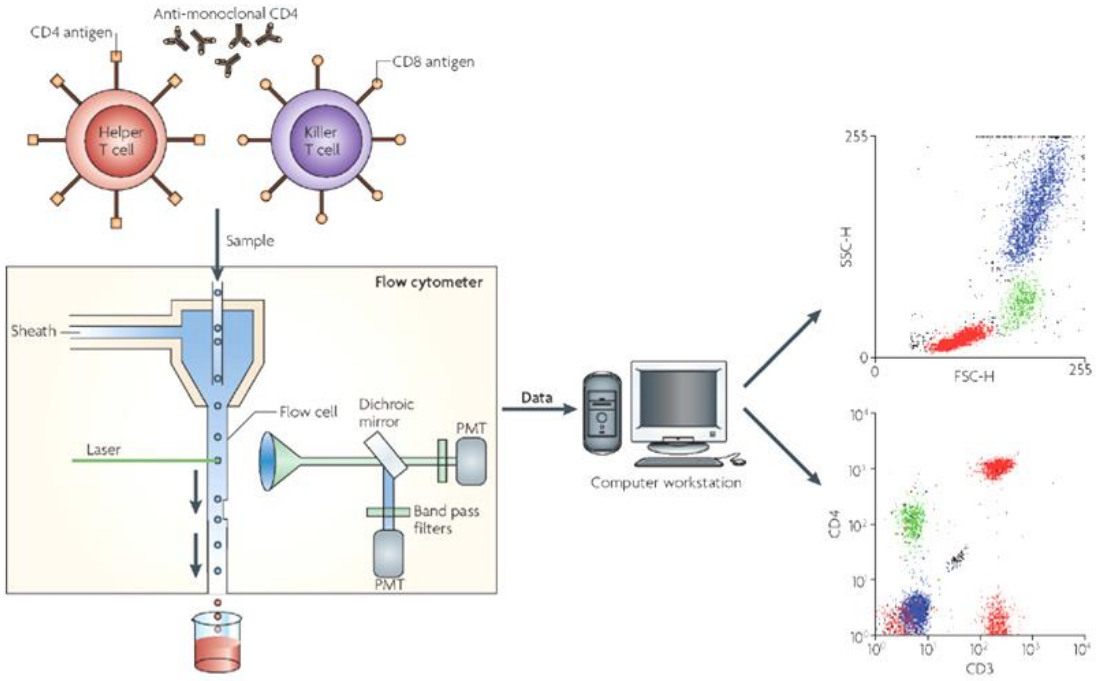
رنگ‌های فلوئورسان در محدودهٔ **488nm** طیف‌های جذبی دارند. بنابراین، یک، تک طول موج تحریکی لیزری، می‌تواند تمامی این دو رنگ را تحریک کند.

فلوسایتومترهای اولیه قادر بودند فقط یک یا دو رنگ فلورسانس را تجزیه و تحلیل کنند اما امروزه دستگاه‌هایی عرضه شده‌اند که قادرند چندین رنگ فلورسانس را به طور همزمان ردیابی و تجزیه و تحلیل کنند. پیشرفت‌های همزمان در وسایل، تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال، رنگ‌های فلوئورسانس، کامپیوتر و نرم‌افزار، دریچهٔ جدیدی جهت استفاده از تکنیک فلوسایتومتری، در آزمایشگاه‌های کلینیکی گشوده است.

سیستم کامپیوتری

این سیستم، پالس‌های دیجیتال آشکارسازها را دریافت کرده و به آنالیز داده‌ها می‌پردازد. امروزه نرم‌افزارهای جدیدی برای آنالیز سریع‌تر داده‌ها در دسترس می‌باشند. همچنین کنترل قسمت‌های مختلف دستگاه فلوسایتومتری بر عهده این سیستم می‌باشد.

اهمیت فلوسایتومتری در بررسی فنوتیپ سلول‌ها

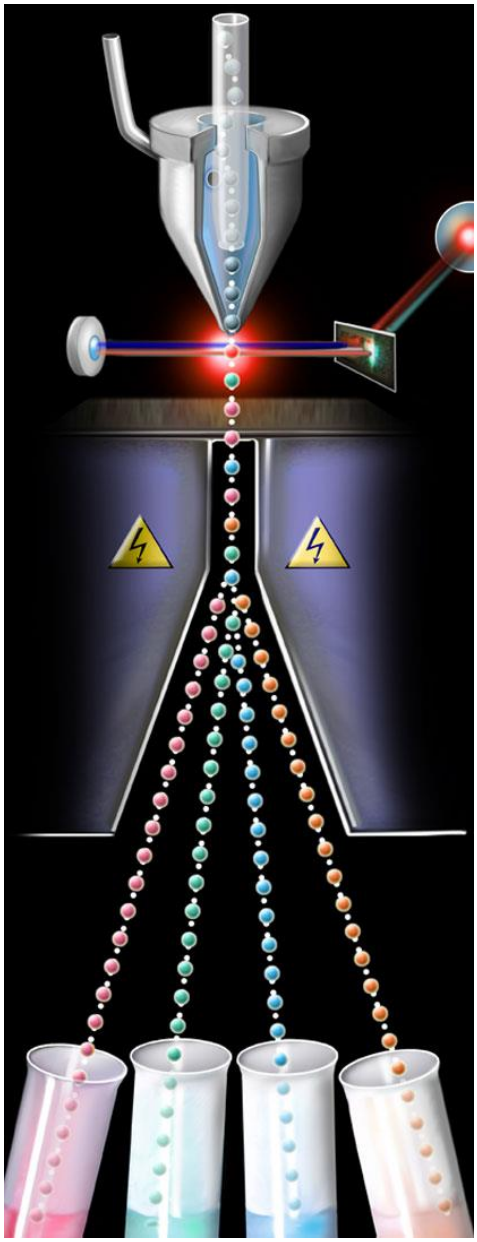


تصویر شماره چهار

آنتی‌ژن‌های سلولی که اصطلاحاً به نام **(CD) clusters of Differentiation** نامیده می‌شود، صرفاً شاخص‌های شناسائی انواع مختلف سلولی نیستند، بلکه فعالیت‌های مهم سلولی را تنظیم می‌کنند و اکثراً از جنس پروتئین یا گلیکوپروتئین هستند، این مولکول‌ها به عنوان گیرنده‌های فاکتورهای اصلی رشد، سیتوکین‌ها و پروتئین‌های سرمی عمل می‌کنند و یا به عنوان آنزیم‌های غشائی فعالیت نموده و اتصال سلول‌ها را به سایر سلول‌ها و اجزاء ماتریکس خارج سلولی میسر می‌نمایند، این شاخص‌های شناسائی به وسیلهٔ متدهای فلوسایتومتری به راحتی قابل تشخیص و ارزیابی می‌باشند. بررسی شاخص‌ها جهت افتراق جمعیت‌های سلولی خاص نیز بکار می‌رود و می‌توان بدین طریق با توجه به این شاخص‌های آنتی‌ژنی، سلول‌ها را از یکدیگر تفکیک کرد. همچنین امروزه با تکنیک فلوسایتومتری **FACS Fluorescence Activated Cell Sorter**علاوه بر خصوصیات سلول‌ها، می‌توان سلول‌ها را از یکدیگر تفکیک نموده و در لوله‌های جمع کننده مخصوص هر نوع سلول جمع‌آوری نمود و بر روی آنها تحقیقات انجام داد.

سلول‌ها از اجزاء مختلفی مثل غشاء سیتوپلاسمی، غشاء هسته‌ای، هسته و سیتوپلاسم تشکیل می‌شوند و تقریباً همه مولکول‌های موجود در قسمت‌های مختلف سلول را می‌توان با استفاده از فلوسایتومتری ردیابی و تعیین مقدار نمود. معمولاً مولکول‌های سطحی موجود در غشاء سیتوپلاسمی به راحتی در دسترس آنتی‌بادی قرار می‌گیرند ولی برای رسیدن آنتی‌بادی یا ماده فلورسانس به مولکول‌های درونی سلول روش‌های مطمئن و مؤثری لازم است. هر سلولی بر حسب نوع و تخصصی که به عهده دارد مولکول‌های مختص به خود را بیان می‌کند؛ بدین معنی که همهٔ ژن‌ها در همه سلول‌ها بیان نمی‌شوند بلکه برحسب وظیفه‌ای که در طی تمایز بر عهده سلول گذاشته شده است و بر حسب محیطی که در آن قرار می‌گیرد هر سلولی خود انتخاب می‌کند که در پاسخ به شرایط محیطی کدام ژن را فعال سازد. بنابر این ردیابی پروتئین‌های سلولی حاصل از بیان ژن‌ها هم در سطح و هم در درون سلول می‌تواند وسیله‌ای بسیار مفید برای شناسایی سلول باشد. مولکول‌های سطحی سلول‌ها تحت نام عمومی **CD** که مخفف **Cluster Differentiation** می‌باشد شناخته می‌شوند و برای ردیابی آن‌ها از آنتی‌بادی‌های منوکلونال کونژوگه با فلوروکروم استفاده می‌شود. مثلاً مارکرهای سطحی سلول‌های **NK** عبارتند از **CD16** و **CD56** که آنتی‌بادی‌هایی با همین نام قادرند این مولکول‌ها را در سطح سلول شناسایی نمایند. اغلب لفظ آنتی‌بادی در گفتار یا نوشتار حذف می‌شود مثلاً کونژوگه **CD16** همان آنتی‌بادی شناسایی کننده **CD16** می‌باشد که متصل به فلوروکروم است، یا کونژوگه **CD34** اشاره به آنتی‌بادی شناسایی کنندهٔ **CD34** دارد که با فلوروکروم مناسبی کونژوگه شده است، مارکر اختصاصی سلول‌های ریشه‌ای تمایز نیافته مغز استخوان می‌باشد.

جداسازی سلولی



تصویر شماره پنج

بیشترین مورد استفاده از فلوسایتومتری، ارزیابی آنتی‌ژن‌های سطحی بیان‌شده بر روی سلول‌ها می‌باشد، اما علاوه بر آن سلول‌ها ممکن است با روش‌های مختلف برای اندازه‌گیری خصوصیات عملکردی بوسیلهٔ فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گیرند. می‌توان تغییرات زمانی بیان گیرنده‌ها را تعیین کرد یا بر همکنش یک نوع سلول را با سلول دیگر اندازه‌گیری نمود. بعلاوه، امکان ارزیابی

تغییرات در فعالیت آنزیم‌ها و پتانسیل غشایی وجود دارد. همچنین می‌توان آزمایشاتی برای نشان دادن فاگوسیتوز و آزادسازی مولکول‌های فعال زیستی انجام داد.

روش جداسازی سلول‌ها با استفاده از خصوصیات فلورسانس آنها توسط ایمونولوژیست‌هایی ابداع شد که تلاش می‌کردند جمعیت‌های خالص سلول‌ها را از نمونه‌های مختلط تهیه کرده و پس از تکثیر آنها در محیط کشت سلولی، نقش مجزای هر سلول را در سیستم ایمنی بررسی نمایند. جداسازهای جریانی وسایلی ضروری و پرطرفدار در علوم بیولوژیکی و علوم دیگر هستند. کارآیی اصلی این جداسازها، چنانچه از نامشان برمی‌آید، جدا کردن جمعیت‌های سلولی دلخواه از میان جمعیتی هتروژن از سلول‌ها برای مطالعهٔ بیشتر می‌باشد. بطور کلی اگر سلول یا ذره‌ای دارای خصوصیات منحصر به فردی از نظر فیزیکی یا شیمیایی باشد با استفاده از آن خصوصیات می‌توان براحتی آن را شناسایی کرده و از دیگر سلول‌های همراه جدا کرد.

با استفادهٔ هم‌زمان از دو روش آنالیز سلولی و جداساز سلولی **Cell Sorter** امکان مطالعهٔ بیشتر و کشت سلول‌های کاملاً شناخته شده از نظر فنوتایپی یا رفتاری فراهم می‌گردد. در حضور یون‌های کلسیم خصوصیات طیفی برخی از رنگ‌های فلورسنت تغییر می‌یابد. از این رنگ‌ها برای اندازه‌گیری تغییرات غلظت کلسیم اجزاء سلولی در هنگامی که سلول‌ها بوسیله انواع محرک‌ها تحریک می‌شوند استفاده می‌شود.

کنترل کیفی

داشتن برنامه‌های کنترل کیفی برای روش‌ها و تجهیزات در هر نوع فلوسایتومتری ضروری بوده و یک نیاز اساسی محسوب می‌گردد. این برنامه‌ها برای اطمینان از کیفیت نتایج بدست آمده به کار برده می‌شوند. همچنین برنامه‌های کنترل کیفی بایستی مرتباً و در حد کفایت انجام شوند تا تشخیص نقاط اشکال به آسانی ممکن گردد. بدین منظور، برنامهٔ کنترل کیفی در هر دو زمینهٔ کنترل کیفی داخلی و روش‌های ارزیابی کیفی خارجی، باید به اجرا گذاشته شوند.

در فلوسایتومتری طی دو مرحلهٔ جمع‌آوری اطلاعات و مرحلهٔ آنالیز اطلاعات امکان خطا وجود دارد که با بکارگیری روش صحیح تهیهٔ نمونه سلولی و تنظیم دقیق دستگاه می‌توان از خطاهای مربوط به مرحلهٔ جمع‌آوری اطلاعات جلوگیری کرد اما توانایی اپراتور در طراحی صحیح آزمایش، تنها جنبه‌ای از کسب اطلاعات است که برای آن روش‌های کنترل خطا وجود ندارد. بدین معنی که انتخاب آنتی‌بادی مناسب و انتخاب فلوروکروم متناسب با غلظت و موقعیت آنتی‌ژن نیازمند تجربیات و اطلاعاتی است که باید توسط محقق کسب شوند.

روش فلوسایتومتری در سایهٔ افزایش روز افزون تعداد آنتی‌بادی‌ها، تترامرها و رنگ‌های تولید شده برای استفاده در ارزیابی فعالیت سلول‌ها به عنوان یک ابزار مهم در مطالعهٔ سلول‌های سیستم ایمنی در آمده است. فلوسایتومتری چند رنگی این امکان را فراهم آورده است که انواع سلول‌های موجود در نمونهٔ خون یا سلول‌های کشت شده به تفکیک مورد ارزیابی قرار گیرند. سلول‌های تحت مطالعه با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی

معرف زیرگروه‌های سلولی، شناسایی می‌شوند و خصوصیات رفتاری آنها نیز با استفاده ازآنتی‌بادی‌های اختصاصی (مثلاً ضد سایتوکین) و یا رنگ‌های ارزیابی کنندهٔ حیات سلولی تعیین می‌شوند.