غلامرضا هدایتی-کارشناس نظارت وارزیابی آزمایشگاه ها
اداره امور آزمایشگاه های معاونت درمان دانشگاه علوم پزشکی مشهد

فلوسایتومتری وکاربردهای بالینی

Flowcytometry & its Clinical Applications

امروزه به کارگیری تکنولوژی‌های مدرن به جهت افزایش سرعت، دقت و سهولت انجام آزمایشات، روز به روز در حال گسترش است. این روش توسط ایمونولوژیست هایی ابداع شد که تلاش می‌کردند جمعیت‌های خالص سلول‌ها را از یکدیگر جدا کنند و پس از تکثیر آنها در محیط کشت سلولی، نقش هر سلول را در سیستم ایمنی بررسی کنند. فلوسایتومتری روشی دقیق و با کارایی بالا که برای شناسایی سلول‌ها (ذرات) و ارزیابی خصوصیّات آنها به کار می‌رود. هر سلولی بر حسب نوع و تخصصی که بر عهده دارد مولکول‌های مختص به خود را بیان می‌کند، یعنی همهٔ ژن‌ها در همه سلول‌ها بیان نمی‌شود 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.

بنابراین 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(Cluster Differentiation) شناخته می‌شود و برای ردیابی آنها از آنتی‌بادی‌های منوکلونال کونژوگه با فلوروکروم استفاده می‌شود. برای نمونه مارکرهای سطحی سلول های پلاکت عبارتند از CD51,CD41,CD61 و آنتی‌بادی‌هایی با همین نام قادرند این مولکول‌ها را در سطح سلول شناسایی کنند. سلول‌ها از اجزای مختلفی مثل غشاء سیتوپلاسمی، غشاء هسته‌ای، هسته و سیتوپلاسم تشکیل می‌شود و تقریبا همه مولکول‌های موجود در قسمت‌های مختلف سلول را می‌توان با استفاده از فلوسایتومتری ردیابی و تعیین مقدار کرد. معمولاً مولکول‌های سطحی موجود در غشاء سیتوپلاسمی به راحتی در دسترس آنتی‌بادی قرار می‌گیرد ولی برای رسیدن آنتی‌بادی یا ماده فلورسانس به مولکول‌های درونی سلول، روش‌های مطمئن و موثری لازم است. این تکنیک بر اساس پراکنده سازی نور توسط سلول‌های مورد آزمایش و انتشار فلورسانس از آنها استوار است. نشر فلورسانس با استفاده مستقیم از فلوروکروم‌های متصل شونده به اجزای سلولی یا ترکیبی از رنگ فلورسنت با آنتی بادی‌های مونوکلونال حاصل می‌شود. این آنتی بادی‌های کونژوگه با فلورسانس می‌توانند مولکول‌های سطحی و یا ترکیبات داخلی سلول‌ها را ردیابی کرده و به آنها متصل شود و شناسایی انواع سلول‌های موجود در یک جمعیت سلولی متنوع را توسط فلوسایتومتری امکان‌پذیر می‌سازند. فلوسایتومتری در دهه اخیر در آزمایشگاه های تشخیص طبی، جهت تشخیص انواع لوسمی های خونی، بیماری های نقص سیستم ایمنی (برای مثال; تست DHR

به روش فلوسیتومتری جهت بررسی توانایی فاگوسیتوز نوتروفیل ها در کودکان و افراد مبتلا به بیماری های گرانولو ماتوز مزمن) در انسان به کار گرفته می شود. همچنین در بخش‌های پژوهشی، برای تعیین پیش آگهی بیماری‌ها و ارزیابی درمان بدخیمی ها استفاده می شود.

کاربردهای فلوسایتومتری

شناسایی و شمارش دقیق سلول ها جهت ارزیابی شاخص های سلولی، اندازه گیری فعالیت آنزیمی، مطالعه فعالیت آپوپتوزی (مرگ ومیر سلولی)، مشخص کردن محتوای اسید نوکلئیک سلول،آزمایش های نفوذ کلسیم کاربرد دارد.

جدول شناسایی مارکرها توسط فلوسایتومتری

سلول‌ها معمولاً براساس بیان آنتی ژن‌های سطحی خود شناسایی می‌شوند. برای مثال;

سلول های خونی	CD Markers	سلول های خونی		CD Markers	سلول های خونی		CD Markers
لنفوسیت B	CD19,20,22	گرانولوسیت	مونوسیت	CD13		لنفوسیت T	CD3
N.K cells	CD56		مونوسیت	CD14, CD64	ماکروفاژ - مونوسیت	T.hellper	CD4
نوتروفیل	CD65	ماکروفاژ	N.K cells	CD16a	N.K cells	T.cytotoxic	CD8

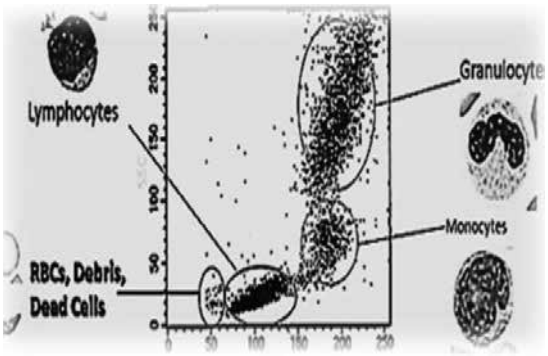
نکاتی در مورد نوع وحجم نمونه های فلوسیتومتری

آسپیره مغز استخوان – خون محیطی– مایعات مختلف از جمله CSF مایع پلور و....

حجم مورد نیاز برای انجام آزمایشات فلوسایتومتری ۲mlخون کامل همانند نمونه CBC و EDTA بهترین ضدانعقاد برای نمونه های خون محیطی و مغز استخوان است ولی از نمونه گرفته شده با هپارین نیز می توان استفاده کرد. آزمایش باید در کمتر از ۲٤ ساعت انجام شود و بهتر است بعد از انجام نمونه گیری، نمونه بلافاصله به آزمایشگاه ارسال شود. نمونه هایی که ۲٤ ساعت از نمونه گیری آن ها گذشته قابل پذیرش نیست. از فریزکردن نمونه خودداری شود زیرا انجماد باعث لیز سلولی شده و ارزیابی را غیر ممکن می سازد. نمونه باید در درجه حرارت اتاق (۲٤–۲۰ $\dot{C}$) به آزمایشگاه انتقال داده شود. (رعایت زنجیره سرد)

اصول آزمایش وتهیه سلول برای فلوسایتومتری

قدم اول بعد از تهیه نمونه، ساختن سوسپانسیون یکنواخت است. نمونه خون در حالت معمول حاوی سلول‌های منفرد است که در پلاسمای خون به صورت معلق هستند. نمونه‌های به دست آمده از مغز استخوان را می‌توان با پی پت کردن مکرر به صورت سوسپانسیون سلول‌های منفرد در آورد. در نمونه بافت‌های جامد و لنفوئیدی، اتصالات سلول به سلول یا سلول به بستر باید شکسته شود و سلول‌ها کاملا آزاد شوند. قدم دوم این است که تا زمان آنالیز نمونه، خصوصیات و عملکرد سلول‌های تحت بررسی باید در حالت طبیعی و دست نخورده حفظ شود. پس از تهیه سوسپانسیون مناسب، سلول‌ها باید با آنتی بادی‌های مونوکلونال کونژوگه نشاندار، مجاور شوند. روش نشاندار کردن تحت تاثیر فاکتورهای زیادی قرار می‌گیرد از جمله میزان اختصاصی بودن آنتی بادی و غلظت آنتی ژن در سطح یا داخل سلول. محیط اطراف سلول‌ها معمولا با pH برابر ۷/۳ و غلظت سلولی بین $۱۰^{۵}$ تا $۱۰^{٦}$سلول در هر میلی لیتر تهیه می‌شود و تحت چنین شرایطی سلول‌ها به صورت یک به یک از مقابل محور تابش نور لیزر عبور خواهند کرد. چنانچه واکنشی صورت گرفته باشد سطح سلول دارای خاصیت فلورسانس شده و با جذب نور لیزر برانگیخته و طول موج بلندتری بازتاب می‌کند. نور بازیافتی در زوایای مختلف مورد سنجش قرار می‌گیرد. معمولا حجم کمی از نمونه (۱ml–۰/۲) برای آنالیز لازم است. قطر سلول‌های ارزیابی شده باید در محدوده ۱ تا۳۰ میکرون باشد. فلوسایتومترهای معمولی که جهت آنالیز سلول‌های خونی طراحی شده‌اند برای ارزیابی ذرات کوچک تر از۱میکرون حساسیت لازم را ندارند، از طرفی وجود ذرات درشت تر از ۳۰ میکرون، موجب انسداد جریان مایع در دستگاه خواهد شد. عاملی که فلوسایتومتری



را به عنوان یک تکنیک فوق‌العاده در مطالعات کلینیکی در می‌آورد این است که سرعت جریان نمونه (۵ تا ۵۰ متر در ثانیه) امکان جمع‌آوری اطلاعات مربوط به ۵۰۰۰ تا۵۰۰۰۰ سلول را در هر ثانیه فراهم می‌نماید.

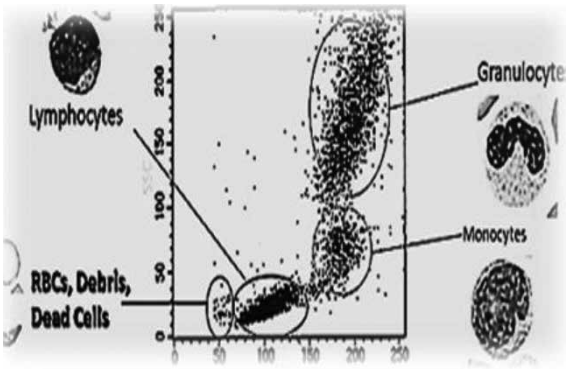
اصول کلی فلوسایتومتری

اجزای اصلی دستگاه فلوسایتومتر

–**سیستم Fluidics**: در روش فلوسایتومتری برای بررسی سلول‌ها باید آنها در یک صف و به صورت تکی درآمده و در سیال مناسبی به صورت معلق از مقابل پرتوی نور (لیزر) عبور نمایند. به طور کلی این سیستم، جریان آرامی از سلول‌ها را به درون جریان حامل سریع وارد می‌کند. مایع حامل، سلول‌ها را در مرکز لوله متمرکز می‌کند، بنابراین سلول‌ها به طور منظم و در یک مسیر مجازی به نقطه اندازه‌گیری منتقل می‌شود. این پدیده که در دستگاه فلوسایتومتر موجب ایجاد اطلاعات منحصربه فرد از یک ذره یا سلول می شود، به نام اثر هیدرودینامیک کانونی خوانده می شود.

– **منبع نوری (اپتیک)**: این سیستم به طور معمول متشکل از یک یا چند منبع نوری لیزر آرگون به همراه تعدادی عدسی، فیلتر و آشکارساز است. عدسی‌ها و فیلترها جهت متمرکز نمودن و انتقال نور منبع به نقطه اندازه‌گیری و نیز برای جمع آوری و هدایت سیگنال های نورفلورسانس ساطع شده از نقطه اندازه‌گیری به آشکارسازها به کار می‌روند.

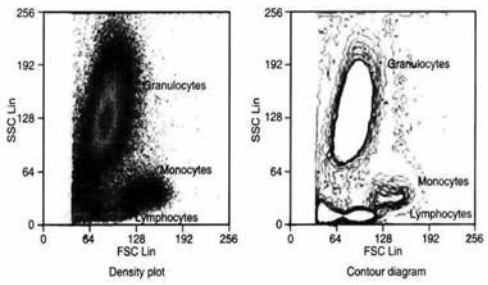
– **سیستم الکترونیک**: شامل مبدل های سیگنال های نوری به سیگنال های الکترونیک قابل پردازش توسط کامپیوتراست. هنگامی که سیگنال های نوری به الکترونیکی تبدیل شد، بر اساس قالبی استاندارد به نام قالب استاندارد فلوسایتومتری(FCS)، اطلاعات حاصل از سیگنال های الکترونیکی ذخیره می شود و با استفاده از نرم افزارهای حاضر می‌توانند برای جمع‌آوری اطلاعات و پردازش آنها، ترسیم



نمودارهای یک، دو یا سه بعدی از اطلاعات و یا برای انجام محاسبات ریاضی و آماری بر روی اطلاعات به کار برده شوند. دستگاه فلوسایتومتر نوع و میزان فلورسانس و همچنین درجه و یا مسیر پراکنده شدن پرتوهای نوری را اندازه گیری می کند. متعاقب اندازه گیری و آنالیز پارامترهای به دست آمده از سلول و یا ذره عبوری از مقابل پرتوهای نوری، اطلاعاتی از اندازه، شکل، ساختار سلول و یا ذره مورد مطالعه به دست می آید. اجزای دقیق نوری و الکترونیکی دستگاه فلوسایتومتر، سیگنال های فلورسانس و پرتوهای نوری پراکنده را توسط لنزهای مناسب جمع آوری کرده، سپس با استفاده از فیلتر های مناسب هر یک از سیگنال های نوری به سوی آشکارساز مناسب هدایت می شود. سپس سیگنال های اخیر توسط نرم افزار پردازش و آنالیز می شود.

فلوروکروم های مورد استفاده در فلوسایتومتری

رایج ترین فلوروکروم هایی که در فلوسایتومتری استفاده می شود CTIF (etanaycoihtosl niecseroulF) و PE (Phycoerythrin)است. این رنگ‌های فلوئورسانس در محدوده ٤٨٨nm طیف‌های جذبی دارد. بنابراین یک طول موج تحریکی لیزری، می‌تواند این دو رنگ را تحریک کند.



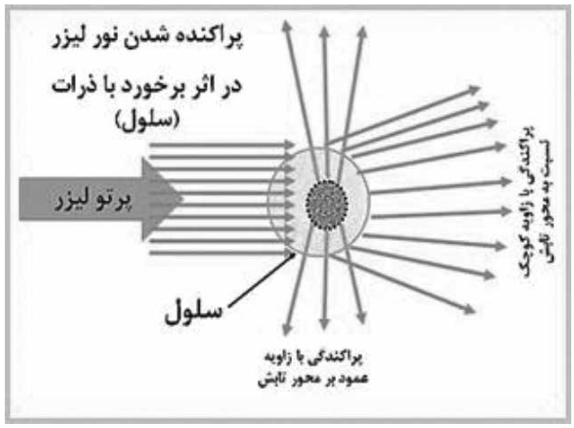
شاخص نتایج

نموادرها نشان دهنده نمایش کمی بیان شاخص های سلولی است، جهت بررسی انتخابی سلول های مورد نظر و حذف نتایج مرتبط با سلول های ناخواسته نظیر سلول های مرده توسطGating که از مهم ترین اصول فلوسایتومتری است انجام می گیرد. هر دستگاه فلوسایتومتری نرم افزار خاصی را برای نمایش و آنالیز داده ها بر روی سیستم خود داراست.

– **نقطه ای**: در این نمودار هر ذره و نقطه نشان دهنده ی

یک سلول و هر جمعیت سلولی به صورت تجمعی از نقاط به صورت پرتراکم یا کم تراکم دیده می شود. جایگاه این ذرات بر روی نمودار بر اساس شدت و ضعف سیگنال توسط آشکار ساز دریافت وثبت می شود.

– **نقشه ای:** در نمودارنقشه ای تجمع نقاط (سلول ها) به صورت خطوط نشان داده می شود وتجمعات سلولی چون گرانولوسیت ها،مونوسیت ها ولنفوسیت ها به طور مستقل ومشخص شبیه نقشه های جغرافیا به نظر می رسد.



خون محیطی	مغز استخوان	اختلال مورد بررسی	CD Markers
✖	–	اختلالات کمبود ایمنی	CD2, CD3, CD4, CD8, CD7, CD19, CD20
✖	✖	اختلال تکثیر B -Cell (ALL, CLL, HCL, MCL)	CD10,CD19, CD20,CD22, CD23,CD34
✖	✖	اختلال تکثیر T -Cell (T-PLL, PTCL, ATLI, L)	CD2,CD3,CD4,CD5,CD7, CD8
✖	✖	اختلالات میلوپرولیفراتیو AML, M0,M7,CML,CMML	CD13, CD33, CD11c, CD14, CD16 , CD34,HLA-DR
✖	✖	اختلال پلاکتی(ITP)	CD41,CD51,CD61
✖	✖	بدخیمی پلاسماسل(MM)	CD38, CD138

جدول نوع نمونه، پانل تشخیصی و اختلال مورد بررسی توسط فلوسایتومتری

منابع:

– Kathy foucar,MD/ organization & operation of a Flow Cytometric Immuno-phentyping in Laboratory.

–Marion G. Macey, PhD/Flow Cytometry Principles and Applications & G.Hawley protocol Flow Cytometry.

– اصول آزمایش با فلوسایتومتر. حسن شریفی یزدی، سید احسان حسینی، سحر هامون نورد. انتشارات آرنا/۱۳۹۳

– فلوسایتومتری و کاربردهای بالینی دکتر پروین میربد /استاد گروه پاتولوژی دانشکده علوم پزشکی تهران، دکتر فاطمه محجوب

– تجربیات شخصی، شغلی در بخش فلوسایتومتری آزمایشگاه مولکولی پژوهشکده بوعلی/ دانشگاه علوم پزشکی مشهد.