

غلامرضا هدایتی-کارشناس نظارت و ارزیابی آزمایشگاه‌ها  
اداره امور آزمایشگاه‌های معاونت درمان دانشگاه علوم پزشکی مشهد

## فلوسایتومتری و کاربردهای بالینی *Flowcytometry & its Clinical Applications*

منوکلونال کونزوگه با فلوروکروم استفاده می‌شود. برای نمونه مارکرهای سطحی سلول‌های 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 تقریباً 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 آنتی‌بادی‌های منوکلونال حاصل می‌شود. این آنتی‌بادی‌های کونزوگه 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 آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، جهت تشخیص انواع لوسمی‌های خونی، بیماری‌های نقص سیستم ایمنی (برای مثال؛ تست DHR

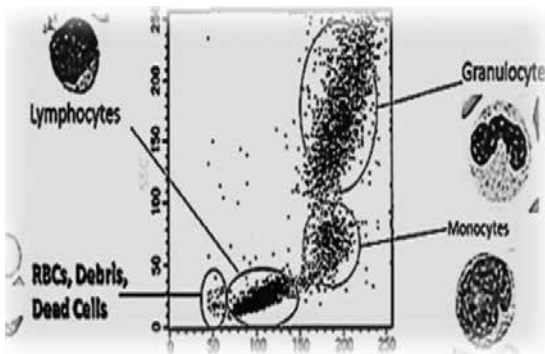


امروزه به کارگیری تکنولوژی‌های مدرن به جهت افزایش سرعت، دقت و سهولت انجام آزمایشات، روز به روز در حال گسترش است. این روش توسط ایمونولوژیست‌هایی ابداع شد که تلاش می‌کردند جمعیت‌های خالص سلول‌ها را از یکدیگر جدا کنند و پس از تکثیر آنها در محیط کشت سلولی، نقش هر سلول را در سیستم ایمنی بررسی کنند. فلوسایتومتری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

## اصول آزمایش و تهیه سلول برای فلوسایتومتری

قدم اول بعد از تهیه نمونه، ساختن سوسپانسیون یکنواخت است. نمونه خون در حالت معمول حاوی سلول‌های منفرد است که در پلاسماي 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 لنفونیدی، اتصالات سلول به سلول یا سلول به بستر باید شکسته شود و سلول‌ها کاملاً 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 معمولاً با pH برابر ۷/۳ و غلظت سلولی بین ۱۰<sup>۵</sup> تا ۱۰<sup>۶</sup> 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. معمولاً حجم کمی از نمونه (۱-۲/۰ ml) برای آنالیز لازم است. قطر سلول‌های ارزیابی شده باید در محدوده ۱ تا ۳۰ میکرون باشد. فلوسایتومترهای معمولی که جهت آنالیز سلول‌های خونی طراحی شده‌اند برای ارزیابی ذرات کوچک تر از ۱ میکرون حساسیت لازم را ندارند، از طرفی وجود ذرات درشت تر از ۳۰ میکرون، موجب انسداد جریان مایع در دستگاه خواهد شد. عاملی که فلوسایتومتری



به روش فلوسیتومتری جهت بررسی توانایی فاگوسیتوز نوتروفیل‌ها در کودکان و افراد مبتلا به بیماری‌های گرانولوز ماتوز مزمن) در انسان به کار گرفته می‌شود. همچنین در بخش‌های پژوهشی، برای تعیین پیش آگهی بیماری‌ها و ارزیابی درمان بدخیمی‌ها استفاده می‌شود.

## کاربردهای فلوسایتومتری

شناسایی و شمارش دقیق سلول‌ها جهت ارزیابی شاخص‌های سلولی، اندازه گیری فعالیت آنزیمی، مطالعه فعالیت آپوپتوزی (مرگ و میر سلولی)، مشخص کردن محتوای اسید نوکلئیک سلول، آزمایش‌های نفوذ کلسیم کاربرد دارد.

## جدول شناسایی مارکرها توسط فلوسایتومتری

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

CD Markers	سلول‌های خونی	CD Markers	سلول‌های خونی	CD Markers	سلول‌های خونی
CD3	لنفوسیت T	CD13	گرانولوسیت، مونوسیت	CD19,20,22	لنفوسیت B
CD4	T.helper	CD14, CD64	مونوسیت	CD56	N.K cells
CD8	T.cytotoxic	CD16a	N.K cells	CD65	نوتروفیل

## نکاتی در مورد نوع و حجم نمونه‌های فلوسیتومتری

آسپیره مغز استخوان - خون محیطی - مایعات مختلف از جمله CSF مایع پلور و ...  
حجم مورد نیاز برای انجام آزمایشات فلوسایتومتری ۲ml خون کامل همانند نمونه CBC و EDTA بهترین ضدانعقاد برای نمونه‌های خون محیطی و مغز استخوان است ولی از نمونه گرفته شده با هیپارین نیز می‌توان استفاده کرد. آزمایش باید در کمتر از ۲۴ ساعت انجام شود و بهتر است بعد از انجام نمونه گیری، نمونه بلافاصله به آزمایشگاه ارسال شود. نمونه‌هایی که ۲۴ ساعت از نمونه گیری آن‌ها گذشته قابل پذیرش نیست. از فریز کردن نمونه خودداری شود زیرا انجماد باعث لیز سلولی شده و ارزیابی را غیر ممکن می‌سازد. نمونه باید در درجه حرارت اتاق (۲۰-۲۴ °C) به آزمایشگاه انتقال داده شود. (رعایت زنجیره سرد)

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 تا ۵۰۰۰۰ 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 منحصر به فرد از یک ذره یا سلول می‌شود، به نام اثر هیدرودینامیک کانونی خوانده می‌شود.

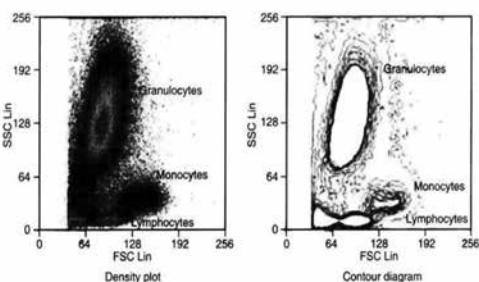
**منبع نوری (اپتیک):** این سیستم به طور معمول متشکل از یک یا چند منبع نوری لیزر آرگون به همراه تعدادی عدسی، فیلتر و آشکارساز است. عدسی‌ها و فیلترها جهت متمرکز نمودن و انتقال نور منبع به نقطه اندازه‌گیری و نیز برای جمع‌آوری و هدایت سیگنال‌های نورفلورسانس ساطع شده از نقطه اندازه‌گیری به آشکارسازها به کار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

**سیستم الکترونیک:** شامل مبدل‌های سیگنال‌های نوری به سیگنال‌های الکترونیک قابل پردازش توسط کامپیوتر است. هنگامی که سیگنال‌های نوری به الکترونیک تبدیل شد، بر اساس قالبی استاندارد به نام قالب استاندارد فلوسایتومتری (FCS)، اطلاعات حاصل از سیگنال‌های الکترونیک ذخیره می‌شود و با استفاده از نرم‌افزارهای حاضر می‌تواند 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 اندازه‌گیری می‌کند. متعاقب اندازه‌گیری 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 می‌آید. اجزای دقیق نوری و الکترونیک دستگاه فلوسایتومتر، سیگنال‌های فلورسانس و پرتوهای نوری پراکنده را توسط لنزهای مناسب جمع‌آوری کرده، سپس با استفاده از فیلترهای مناسب هر یک از سیگنال‌های نوری به سوی آشکارساز مناسب هدایت می‌شود. سپس سیگنال‌های اخیر توسط نرم‌افزار پردازش و آنالیز می‌شود.

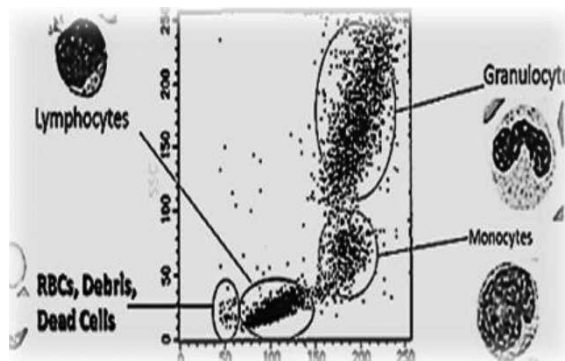
### فلوروکروم‌های مورد استفاده در فلوسایتومتری

رایج‌ترین فلوروکروم‌هایی که در فلوسایتومتری استفاده می‌شود (CTIF) (etanaycoihtosl niecserouLF) و PE (Phycoerythrin) است. این رنگ‌های فلورسانس در محدوده ۴۸۸nm طیف‌های جذبی دارد. بنابراین یک طول موج تحریکی لیزری، می‌تواند این دو رنگ را تحریک کند.



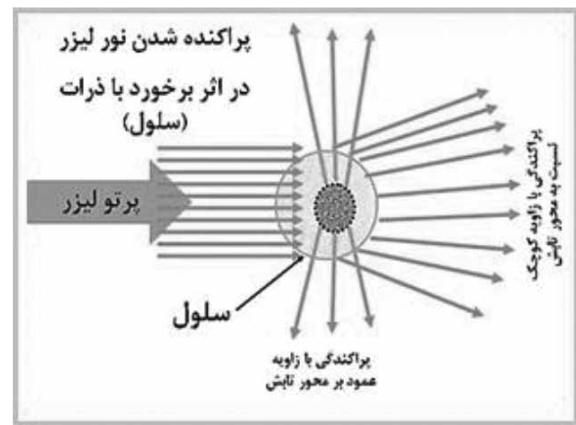
### شاخص نتایج

نمودارها نشان‌دهنده نمایش کمی بیان شاخص‌های سلولی است، جهت بررسی انتخابی سلول‌های مورد نظر و حذف نتایج مرتبط با سلول‌های ناخواسته نظیر سلول‌های مرده توسط Gating که از مهم‌ترین اصول فلوسایتومتری است انجام می‌گیرد. هر دستگاه فلوسایتومتری نرم‌افزار خاصی را برای نمایش و آنالیز داده‌ها بر روی سیستم خود داراست. - نقطه‌ای: در این نمودار هر ذره و نقطه نشان‌دهنده‌ی



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 و ثبت می شود.

- **نقشه ای:** در نمودار نقشه ای تجمع نقاط (سلول ها) به صورت خطوط نشان داده می شود و تجمعات سلولی چون گرانولوسیت ها، مونوسیت ها و لنفوسیت ها به طور مستقل و مشخص شبیه نقشه های جغرافیا به نظر می رسد.



**منابع:**

- Kathy Foucar, MD/ organization & operation of a Flow Cytometric Immunophenotyping 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.

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

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