مهندس احسان درخشان نیا

اصول فلوسایتومتری

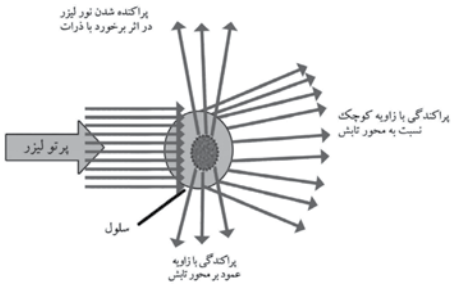
در تکنیک‌های وسترن‌بلات، PCR و Real time نیازمند دسترسی به کل محتوای ژنتیکی سلول و یا محتوای پروتئینی هستیم، بنابراین باید غشای سلول تخریب شود و درنتیجه ما خود سلول را دیگر نخواهیم داشت. اما برخی از تکنیک‌های شناسایی پروتئین وجود دارد که بدون ازبین رفتن غشای سلول می‌توانند در تشخیص سلول، محقق را یاری کنند. از جمله این تکنیک‌ها می‌توان به فلوسایتومتری اشاره کرد.

فلوسایتومتری روش سنجش ایمنولوژی بسیار سریع و قدرتمندی است که برای شناسایی ذرات (سلول‌ها) و ارزیابی خصوصیات آن‌ها به کار می‌رود. ذرات مورد آزمایش به‌صورت معلق در مایع با سرعتی حدود ۵ تا ۵۰ متر در ثانیه از میان منفذی باریک و از مقابل پرتوی باریک از نور لیزر عبور می‌کنند. بدین ترتیب امکان جمع‌آوری اطلاعات مربوط به ۵۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰ سلول در هر ثانیه فراهم می‌شود. اغلب حجم مورد نیاز از نمونه مورد آزمایش نیز خیلی کم و حدود ۱۰۰ میکرولیتر است. در مورد دقت این روش نیز باید گفت که قادر است تعداد ۱سلول سرطانی در میان ۱۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ سلول عادی موجود در نمونهٔ مغز استخوان را شناسایی کند.

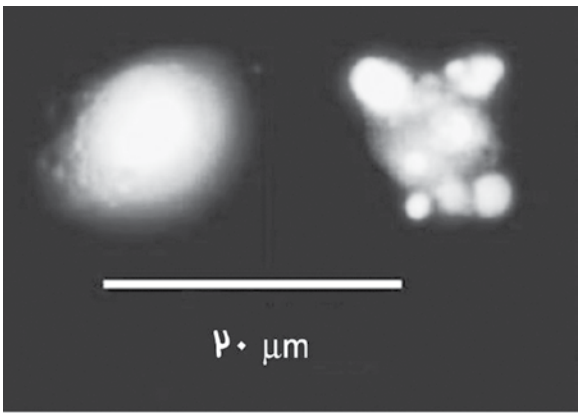
فلوسایتومتری نقش مهمی در زمینه‌های مختلف آسیب‌شناسی، هماتولوژی، ایمنی‌شناسی، بیماری‌های عفونی، بررسی پیوند اعضا، نئوپلازیا و ژنتیک دارد و از طرفی بررسی وقایع چرخه سلولی و نقایص موجود در DNA جهت تشخیص انواع لوسمی‌ها و لنفوم‌ها به وسیله فلوسیتومتری امکان‌پذیر است. همچنین این روش در تشخیص بیماری‌ها، تعیین پیش‌آگهی و همچنین برای ارزیابی درمان بدخیمی‌ها کاربرد دارد. به وسیله این دستگاه می‌توان پاسخگویی سلول‌های سرطانی به داروهای ضد آن و نیز تغییرات ویروس HIV برروی گلبول‌های سفید خون بیمار را مورد مطالعه قرار داد. فلوسیتومتری امکان آنالیز بسیار سریع و دقیق سلول‌های بدن، فنوتیپ سلول‌های سرطانی، آنالیز کروموزوم‌ها، میزان DNA موجود در درون سلول‌ها، بررسی طبیعی و غیرطبیعی بودن DNA و کروموزوم‌ها، میزان آنتی‌ژن‌های سطح سلولی و درون سلولی و ... را برای بسیاری از کاربران فراهم ساخته است.

اساس این روش بر خصوصیات پراکنده‌سازی نور توسط سلول‌ها (شکل۱) و نیز بر نشر فلورسانس از آن‌ها (شکل۲) استوار است. همچنانکه از این شکل‌ها پیداست، نور لیزر به نمونه تابیده می‌شود و در نتیجه مولکول‌های فلورسانس نمونه یا سطح سلول، نورهایی در جهات مختلف پراکنده می‌کنندکه با آشکارسازی آن‌ها و تبدیل آن‌ها به ولتاژ قابل خوانش می‌توان اطلاعات مفیدی را به‌دست آورد. نشر فلورسانس می‌تواند با استفاده مستقیم از مواد رنگ‌کننده فلورسانس حاصل شود (مثل رنگ‌کننده‌های DNA یا RNA که هم خصوصیت فلورسانس بودن را دارا است و هم خود انتخاب می‌کنند که به کدام جزء سلولی متصل شوند) یا ترکیبی از رنگ فلورسانس با آنتی‌بادی‌های تک‌دودمانی (مونوکلونال) که تحت نام عمومی کونژوگه مورد استفاده قرار می‌گیرد.

اگر چه سلول‌ها بخودی‌خود دارای فلورسانس اندکی در برخی طول‌موج‌ها هستند، اما بدون به کارگیری نور تهییج‌کننده که اغلب لیزر است هیچ سیگنالی تولید و به ردیاب‌های دستگاه ارسال نخواهد شد. سیگنال‌های ردیابی شده توسط دستگاه یا از منشا نور لیزر دستگاه است که پس از برخورد به سلول در جهات مستقیم یا عمود بر محور تابش لیزر پراکنده شده و به ردیاب‌ها می‌رسد و یا از منشا فلوروکروم متصل به سطح ذره است. فلوروکروم‌های متصل شده به سطح یا داخل سلول بر اثر تابش نور لیزر تهییج شده و انرژی نور تابیده شده را جذب کرده و سپس در طول موج دیگری به صورت تابش فلورسانس آزاد می‌سازد.



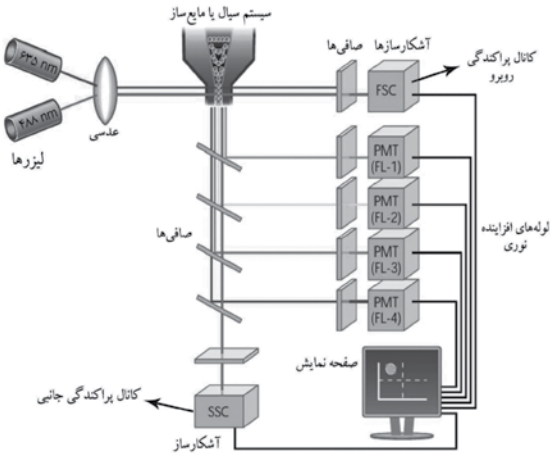
شکل۱. پراکنده‌سازی نور لیزر تابیده شده توسط سلول‌ها.



شکل۲. نشر فلورسانس از سلول توسط نور لیزر تابیده شده به آن

اجزای فلوسایتومتر

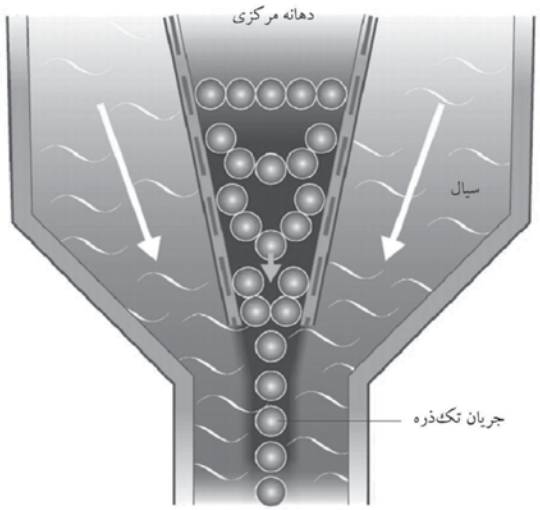
هر دستگاه فلوسایتومتر دارای چهار قسمت اصلی است که عبارتند از سیستم جریان مایع یا سیال (Fluidics system)، سیستم نوری و آشکارسازها (Optics and detecting)، سیستم پردازش سیگنال (Signal processing) و سیستم تقسیم‌بندی الکتریسیته ساکن سلول‌ها (Electrostatic cell sorting). این قسمت‌ها در شکل۳ نشان داده شده‌اند و در ادامه هر کدام را به‌طور جداگانه مورد بررسی قرار می‌دهیم.



شکل۳. نمای کلی از یک سیستم فلوسایتومتر و قسمت‌های مختلف آن.

- **سیستم جریان مایع یا سیال**

یکی از مهم ترین کاربردهای فلوسایتومتری، توانایی آن در اندازه‌گیری ویژگی‌های تک‌تک ذرات است. وقتی یک نمونه حل شده به درون فلوسایتومتر تزریق می‌شود، ذرات به صورت تصادفی در یک توزیع فضایی سه‌بعدی پخش می‌شود. نمونه‌ها باید به صورت تک‌تک از مقابل سیستم نوری دستگاه عبورکنند. این فرآیند توسط سیستم جریان مایع فراهم می‌شود. سیستم جریان مایع شامل یک هسته یا کانال مرکزی است که مسئول تزریق نمونه‌هاست، پس از آن نمونه به وسیله یک غلاف خارجی که شامل یک جریان مایع سریع تر است، محصور می‌شود. این حرکت مایع غلافی، یک اثر کشندگی بزرگی را در باریک‌کردن اتاقک مرکزی ایجاد می‌کند. این تغییر سرعت از مرکز، یک جریان سهمی‌وار که دارای بیشترین سرعت در مرکز و سرعت صفر در کناره‌هاست، ایجاد می‌کند. این اثر یک فهرست خطی از ذرات فراهم می‌کند که به آن تمرکز حرکت مایع می‌گویند(شکل٤). اگر از لوله‌های باریک‌تر جهت اطمینان از انتقال تکرارپذیر سلول‌ها استفاده شود، احتمال دارد با عبور سلول‌های بزرگ تر منجر به بسته‌شدن مسیر شود. برای حل این مشکل از روش کانونی هیدرودینامیک (Hydrodynamic focusing) استفاده می‌شود. در این روش، جریان آرامی از سلول‌ها را به درون جریان حامل سریع، وارد می‌کنند.



شکل٤. چگونگی متمرکزسازی هیدرودینامیکی که جریانی از تک ذرات تهیه می‌کند.

- **سیستم نوری و آشکارسازها**

سیستم نوری فلوسایتومتر متشکل از یک یا چند منبع نوری به همراه یک سری از فیلترها (یا آینه‌ها) و آشکارسازهاست.

✔ **منبع نوری**

امروزه در بیشتر سیستم‌های فلوسایتومتری مدرن از لیزرها و لامپ‌های قوسی به‌عنوان منابع نوری استفاده می‌شود. لیزرها یک منبع نور تک‌رنگ-تک طول‌موج هستند که در جداسازی نور پراکنده شده از نور فلورسانس کارآیی دارند. پرکاربردترین لیزرها، لیزر یون آرگون با طول موج ٤٨٨ نانومتر و لیزر He-Ne با طول‌موج قرمز ٦٣٣ نانومتر هستند. لیزرهای دیودی با طول موج ٦٣٥ نانومتر نیز به‌دلیل پایداری و قیمت ارزان مورد استفاده قرار می‌گیرند.

لامپ‌های قوسی نسبت به لیزرها بسیار ارزان‌تر هستند و به‌وسیله مشتعل‌کردن گاز محصور در یک لامپ، تابش‌های

رنگی ایجاد می‌کنند. معمولاً از لامپ‌های زنون و جیوه بیشتر استفاده می‌شود. با این وجود نور حاصل شده نوری بی‌ثبات و ناهمدوس و مخلوطی از طول‌موج‌های مختلف است و برای استفاده از آن باید از فیلترهای نوری استفاده شود.

✔ فیلترها

فیلترها یا آینه‌ها جهت انتقال نور منبع به نقطه اندازه‌گیری و نیز برای انتقال نور پراکنده و فلورسانس از نقطه اندازه‌گیری به آشکارسازها به کار می‌رود.

این فیلترها نوع خاصی از آینه‌ها است که طول‌موج خاصی را از خود عبور داده و طول موج خاصی را منعکس می‌کند. به این گونه فیلترها یا آینه‌ها، Dichroic mirror گفته می‌شود. بسته به اینکه این آینه‌ها چه طول موج خاص را عبور و یا منعکس می‌کنند به سه دسته تقسیم‌بندی می‌شوند:

✔ فیلترهای Long Pass

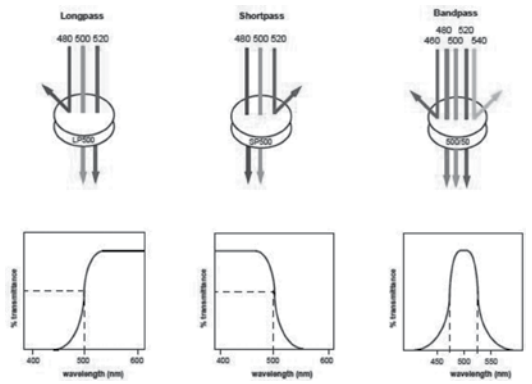
این گونه فیلترها طیف نوری با طول موج‌های برابر یا بیشتر از مقدار مشخصی را از خود عبور می‌دهند و مابقی را منعکس می‌کنند. به عنوان مثال فیلتر BP ۵۰۰ طیف‌های نوری با طول موج‌های برابر یا بیشتر از ۵۰۰ نانومتر را از خود عبور می‌دهد و طول موج‌های کمتر از آن را منعکس می‌کند.

۱- فیلترهای Short Pass

در این فیلترها طیف‌های نوری با طول موج‌های برابر یا کمتر از مقدار تعیین‌شده عبور می‌کنند و غیر از آن منعکس می‌شود، برای مثال فیلتر SP ۵۰۰ طیف‌های نوری با طول موج‌های برابر یا کمتر از ۵۰۰ نانومتر را از خود عبور می‌دهد و طول‌موج‌های بیشتر را منعکس می‌کند.

۲-فیلترهای Band Pass

فیلترهایی هستندکه محدوده مشخصی از طیف نوری را از خود عبور می‌دهند. برای مثال فیلتر BP ۵۰۰/۵۰ طیف نوری بین ٤٧٥ تا ٥٢٥ نانومتر را عبور می‌دهد و غیر از آن را منعکس می‌کند (شکل۵).

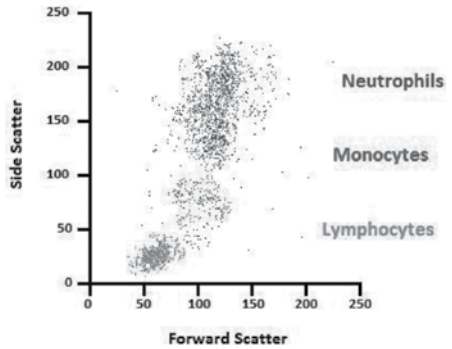


شکل۵. فیلترهای نوری فقط طول موج خاصی را عبور داده و مانع عبور طول موج‌های دیگر می‌شود. در این شکل نحوه عملکرد فیلترهای Long Pass ,Short Pass ,Band Pass نشان داده شده است.

✔ آشکارسازها

سلول‌ها پس از مکش توسط دستگاه درنهایت با لیزر روبرو می‌شود. نتیجه برخورد نور لیزر به یک سلول، پراکندگی نور در جهت‌های مختلف است که گاهی با تغییر در طول موج نیز همراه است. در حقیقت زمانی که نور لیزر به ذره‌ای برخورد می‌کند، برخی از پرتوهای لیزر با همان طول موج از جوانب سلول گذشته و در زوایای ۲ تا ۱۰ درجه در مقابل سلول پراکنده می‌شود که به آن پراکندگی جلویی (Forward Scatter, FSC) گفته می‌شود و در حقیقت بیانگر اندازه (Size) سلول است که می‌توان به وسیله‌ی آن، اندازه‌ی سلول را مورد بررسی قرار داد. همچنین با استفاده از آن می‌توان سلول‌های سالم را از سلول‌های ناسالم تشخیص داد. برخی از پرتوهای لیزر نیز به درون سلول وارد شده و به ساختارهای درونی سلول مثل گرانول‌ها، واکوئل‌ها، هسته و ساختارهای درون سلولی برخورد کرده و در زوایای ۱۰ تا ۹۰ درجه پراکنده می‌شود. این پراکندگی‌ها که نشان‌دهنده‌ی پیچیدگی‌های درون سلول هستند، پراکندگی جانبی (Side Scatter,SSC) نام دارد و در حقیقت نشان‌دهنده میزان گرانولوسیتی سلول است. طول موج پراکندگی جانبی نیز برابر با طول موج تابیده به سلول است. هر دوی پراکندگی جلویی و پراکندگی جانبی، اطلاعات مفیدی از ذرات را فراهم می‌کنند و با ترکیب این اطلاعات به‌دست آمده می‌توان تفاوت بین سلول‌های مختلف موجود در یک نمونه ناهمگون را اندازه‌گیری کرد.

به طور کلی هر ذره‌ای که از مقابل نور لیزر عبور می‌کند، دارای یک اندازه و گرانولیتی مشخص است که در نمودارهای فلوسایتومتری قابل ردیابی و نمایش است؛ به طور مثال اگر سلول‌های خون محیطی انسان را در دستگاه فلوسایتومتری بررسی کنیم شاهد جمعیت‌های مختلف سلولی از جمله مونوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها خواهیم بود که بسته به اندازه و گرانولیتی‌شان در نمودار فلوسایتومتری قابل تمیز از هم هستند (شکل٦).



شکل۶. جمعیت‌های مختلف سلولی از جمله مونوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها و لنفوسیت که بسته به اندازه و گرانولیتی‌شان در نمودار فلوسایتومتری قابل تمیز از هم هستند.

اما قابل ذکر است که در اکثر موارد نمی‌توان سلول‌ها را بر حسب اندازه و گرانولیتی آن‌ها با هم قیاس کرد زیرا بسیاری از آنها شبیه هم هستند و اندازه و گرانولیتی مشابه دارند. به راحتی نمی‌توان از روی سایز و اندازه و گرانولیتی یک سلول پی به ماهیت آن برد. یکی از مهم‌ترین کلیدها در رفع این مشکل استفاده از آنتی‌بادی و آنتی‌ژن و واکنش بین این دو با هم است به طوری که اگر ما بتوانیم برای شناسایی سلول موردنظر خود آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن را شناسایی و آن آنتی‌بادی را به رنگی یا فلوروکرومی متصل کنیم خواهیم توانست سلول مورد هدف را شناسایی کنیم. اما این دستگاه به چه شکل می‌تواند رنگ مورد استفاده را شناسایی کند؟ همان طور که می‌دانیم هر مولکول در اطراف خود دارای الکترون‌هایی است که در اطراف هسته در حال گردش‌اند. حال اگر این الکترون‌ها توسط منبع نوری مانند لیزر برانگیخته شود، از لایه اصلی خود خارج شده و به مدار بالاتر می‌رود. اما این الکترون‌ها تمایل به ماندن در لایه‌های بالاتر را نداشته و تمایل دارند به لایه خود حرکت کنند. این برگشت از یک لایه بالاتر به لایه پایین‌تر با از دست دادن انرژی همراه است. حال اگر این مولکول یک فلورکروم باشد بنابراین انرژی از دست رفته را به شکل نور نمایش خواهد داد.

به هنگام آماده‌سازی سلول‌ها و اتصال رنگ‌های گوناگون فلورسانس به سلول، پرتوهای تابیده شده پس از برخورد تغییر طول موج داده و در زوایای ۱۰ تا ۹۰ درجه پراکنده می‌شود که آن را به عنوان پراکندگی‌های فلورسانس (Fluorescence Scatter) می‌شناسند. طول موج بازتابی در این نوع پراکنش با توجه به رنگ فلورسانس به کار رفته متغیر است. سپس طیف‌های نوری ایجاد شده توسط فیلترها و آیینه‌ها به سمت آشکارسازها(Detector) هدایت شده و سیگنال‌های ایجاد شده را ثبت می‌کنند.

فلوسایتومتر از کانال‌های فلورسانسی جداگانه‌ای برای مشاهده نور تابشی استفاده می‌کند. تعداد این آشکارسازها بسیار متفاوت است و معمولاً از دیودهای نوری سیلیکونی و از لوله‌های افزاینده نوری (Photomultiplier tubes) هستند. دیودهای نوری سیلیکونی بیشتر برای اندازه‌گیری نورهای پراکنده جلویی استفاده می‌شود، به ویژه زمانی که شدت سیگنال‌های دریافتی زیاد باشد. لوله‌های افزاینده نوری حساس‌تر هستند و برای خوانش پرتوهای پراکنده و فلورسانس مناسبند.

- **پردازش سیگنال**

هنگامی که نور با یک آشکارساز نوری برخورد می‌کند، یک جریان بسیار کوچک در حد چند میکروآمپر تولید می‌کند. مجموع این برخوردها یک ولتاژی ایجاد می‌کند که دامنه آن متناسب با مجموع فوتون‌های نوری است که توسط آشکارساز دریافت شده‌اند. سپس این ولتاژ توسط یک سری تقویت کننده‌های خطی یا لگاریتمی تقویت شده و با یک مبدل آنالوگ به دیجیتال به یک سیگنال الکتریکی تبدیل می‌شود که قابلیت نمایش را داشته باشد.

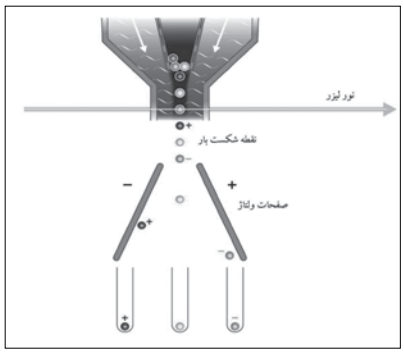
اصولاً تقویت‌کننده‌های لگاریتمی در مطالعات فلورسانسی مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا این نوع تقویت‌کننده‌ها سیگنال‌های ضعیف را گسترده و سیگنال‌های قوی را فشرده می‌کنند. این ویژگی در نمایش هیستوگرام، خود را نشان می‌دهد. تقویت کننده‌های خطی در سیگنال‌هایی که گستردگی کمی دارند، مفید و قابل استفاده است (برای مثال در تحلیل DNA).

اندازه‌گیری هر آشکارساز، نشانگر یک پارامتر، مثل پراکندگی جلویی، پراکندگی جانبی و فلورسانس است. داده‌های جمع‌آوری شده در هر پارامتر تحت عنوان وقایع، نشان‌دهنده تعداد سلول‌هایی است که دارای ویژگی‌های خاص فیزیکی یا نشانگرهای مورد نظر است.

- **سیستم تقسیم‌بندی الکتریسیته ساکن سلول‌ها**

یکی از مهم ترین کاربردهای فلوسایتومتری جداسازی سلول‌ها براساس زیرمجموعه یا شکل ظاهری برای مطالعات بیولوژیکی بیشتر است. پس از آنکه نمونه با روش حرکت مایع متمرکز شد و هر ذره به وسیله پرتو نوری مورد بررسی قرار گرفت، سیگنال پراکندگی و فلورسانس ناشی از آن با معیارهای طبقه‌بندی شده دستگاه مقایسه می‌شود. اگر داده‌های ذره مورد نظر با معیارهای انتخابی هماهنگ بود، جریان سیال در نقطه خروجی دهانه سیستم جریان مایع، باردار می‌شود. بارداری الکتریسیته ساکن در زمان دقیقی به نام نقطه شکست (break-off point) رخ می‌دهد.

برای اجتناب از جابه‌جا شدن تصادفی نقطه شکست و اندازه قطره‌های مشابه، دهانه با یک فرکانس بالایی نوسان می‌کند. پس از این مرحله، قطره‌ها از یک میدان الکتریسیته ساکن قوی عبور می‌کنند که بر اساس نوع و میزان بار، مسیر حرکت آنها به سمت چپ یا راست منحرف می‌شود (شکل۷).



شکل۷. دسته‌بندی جریان سلولی با استفاده از الکتریسیته ساکن

روش انجام فلوسایتومتری

برای انجام فلوسایتومتری لازم است که ابتدا سلول‌ها با فلوروکروم‌ها نشاندار شود. از طرفی برای نشاندار کردن اجزای داخلی سلول باید اقدامات خاصی را انجام داد تا آنها در دسترس آنتی‌بادی یا ماده فلورسانس قرار گیرند. روش‌های رنگ‌آمیزی با فلوروکروم‌ها و استفاده از مواد نفوذپذیر کننده‌ی متنوع برای نفوذپذیر کردن سلول‌ها خود بحث دیگری است که باید جداگانه به آن پرداخته شود. تعداد فلوروکروم‌های مورد استفاده برای فلوسایتومتری در طی سالیان متمادی به‌طور مرتب 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.

برای انجام هر نوع فلوسایتومتری ابتدا باید سلول‌ها را آماده کرد به‌طوری که سلول‌ها به‌صورت تکی در آمده 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 آماده‌سازی 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 شده و یا با آنتی‌بادی‌های کونژوگه با فلوروکروم نشاندار شود. روش نشاندارکردن تحت تاثیر عوامل زیادی قرار می‌گیرد که از جمله آن‌ها می‌توان میزان اختصاصی بودن آنتی‌بادی و غلظت آنتی‌ژن در سطح یا داخل سلول، مناسب بودن غلظت آنتی‌بادی مورد استفاده و به‌کار بردن کنترل‌های مثبت و منفی مناسب در آنالیز سلول‌ها را نام برد.

در فلوسایتومتری طی دو مرحلهٔ جمع‌آوری اطلاعات و مرحلهٔ آنالیز اطلاعات امکان خطا وجود دارد که با به‌کارگیری روش صحیح تهیهٔ نمونه سلولی و تنظیم دقیق دستگاه می‌توان از خطاهای مربوط به مرحلهٔ جمع‌آوری اطلاعات جلوگیری کرد. اما توانایی کاربر 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.

بخش الکترونیکی دستگاه فلوسایتومتری

اولین دستگاه‌های فلوسایتومتری خودکار نبوده و کاربر برای کارکردن می‌بایست به بخش‌های مختلف دستگاه از نظر علمی آگاهی داشته باشد. اما بهبود سرعت بخش‌های مختلف الکترونیکی، کاهش ابعاد و مصرف انرژی کم باعث افزایش سرعت و حساسیت بیشتر این دستگاه‌ها شده است. خودکار کردن فرایندهای پیچیده‌ای که قبلاً نیاز به اطلاعات زیادی داشت، باعث افزایش بیشتر کاربرد آن و نیز استفاده کاربران بیشتری از آن شده است.

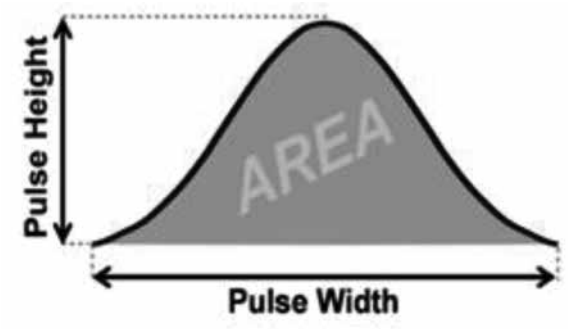
بخش الکترونیک دستگاه به سه قسمت اصلی تقسیم‌بندی می‌شود که عبارتند از: الکترونیک بخش آشکارسازی، مدارهای اندازه‌گیری و مدارهای محاسباتی.

الکترونیک بخش آشکارسازی شامل تغییرات فوتون به فوتوالکترون، تبدیلات جریان به ولتاژ، ذخیره‌سازی، تقویت‌کننده و تمایزکننده است. مشکل اندازه‌گیری به‌ویژه برای فلورسانس کم‌نور و میرا این است که اندازه‌گیری‌ها باید در محیطی پر از نویز (نویزهای نوری و الکترونیکی) انجام گیرند. وقتی سیگنال ضعیفی روی نویز زمینه بالا قرار می‌گیرد، تغییرات سیگنال زمینه، دقت اندازه‌گیری سیگنال‌های اصلی کوچک را محدود می‌کند. روی‌هم رفته، محدودیت آشکارسازی سیگنال‌های کوچک توسط خطای نویز زمینه تعیین می‌شود. وظیفه قسمت الکترونیک آشکارساز این است که نسبت سیگنال به نویز را در اندازه‌گیری به بیشترین مقدار ممکن برساند، یعنی بتواند نویز زمینه را حذف کند.

آشکارسازهای دیود نوری و لوله‌های افزاینده نوری در پاسخ به ورودی نوری، جریان یا شار الکترون تولید می‌کنند. به دلیل این که سیستم‌های الکترونیکی، ولتاژ را اندازه‌گیری و مقایسه می‌کنند، باید خروجی آشکارساز به ولتاژ تبدیل شود. تبدیل جریان به ولتاژ با عبور جریان یا شار الکتریکی از یک مقاومت انجام می‌گیرد. بر اساس قانون اهم، ولتاژ تولیدشده برابر حاصل ضرب جریان در مقاومت است و چون مقدار مقاومت ثابت است، ولتاژ خروجی به‌طور مستقیم متناسب با جریان ورودی است. مدار الکترونیکی که این تبدیل را انجام می‌دهد، تقویت‌کننده نام دارد که می‌تواند در لوله‌های افزاینده نوری مدار جاسازی شود. این مدار جریان فوتوالکترون‌ها را به ولتاژ تبدیل کرده و تقویت خطی ولتاژ را فراهم می‌کند.

سیگنال‌ها در سیستم‌های قدیمی به‌شکل آنالوگ ثبت می‌شدند در حالی که امروزه یک مبدل آنالوگ به دیجیتال (Analogue to Digital Converter (ADC آنها را به داده‌های دیجیتالی تبدیل می‌کند، به این شکل که با توجه به کیفیت ثبت سیگنال در آشکارساز برای هر مقدار ولتاژ، حجمی از داده کامپیوتری به صورت بایت (Byte) درنظر می‌گیرد به این معنی که ولت به بایت تبدیل می‌شود. این امر قابلیت بیشتر

آنالیز سیگنال‌ها، تقویت و یا تضعیف آن‌ها را میسر می‌سازد. زمانی که یک سلول از مقابل منبع نوری عبور می‌کند بر روی تمام آشکارسازها سیگنال ایجاد می‌کند که همان پالس الکتریکی (ولتاژ) است. بر اساس این که چه میزان از ذره در مقابل منبع نوری قرار گیرد، پالس ایجاد شده می‌تواند ضعیف یا قوی باشد. چنانچه نمودار ولتاژ بر حسب زمان برای هر سلول رسم شود به صورت یک پالس خواهد بود که واجد یک پیک است. هر پالس دارای ویژگی‌های ارتفاع (Height;H) ، پهنا (Width;W) و سطح زیر نمودار (Area;A) است (شکل۸).



شکل۸. نمودار ولتاژ بر حسب زمان برای هر سلول به صورت یک پالس خواهد بود که واجد یک پیک است. هر پالس دارای ویژگی‌های ارتفاع، پهنا و سطح زیر نمودار است.

کاربردها

• امکان شناسایی و اندازه‌گیری سلول‌های آپوپتوتیک

سلول‌ها از اجزای مختلفی مثل غشای سیتوپلاسمی، غشای هسته‌ای، هسته و سیتوپلاسم تشکیل می‌شود و به طور تقریبی همه مولکول‌های موجود در قسمت‌های مختلف سلول را می‌توان با استفاده از فلوسایتومتری ردیابی و تعیین مقدار کرد. معمولاً مولکول‌های سطحی موجود در غشای سیتوپلاسمی به‌راحتی در دسترس آنتی‌بادی قرار می‌گیرد ولی برای رسیدن آنتی‌بادی یا ماده ی فلورسانس به مولکول‌های درونی سلول، روش‌های مطمئن و موثری لازم است. هر سلولی بر حسب نوع و تخصصی که بر عهده دارد مولکول‌های مختص به خود را بیان می‌کند. بدین معنی که همه ی ژن‌ها در همه ی سلول‌ها بیان نمی‌شود. بلکه برحسب وظیفه‌ای که در طی تمایز بر عهده ی 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.

آپوپتوز یکی از شکل‌های مرگ سلول است که از نظر بیولوژی اهمیت زیادی دارد و به همین دلیل ردیابی و اندازه‌گیری آپوپتوز در تحقیقات و موارد بالینی اهمیت پیدا می‌کند. سلول‌های در حال آپوپتوز نشانه‌های زیادی دارند که قابل اندازه‌گیری با فلوسایتومتری هستند. این نشانه‌ها عبارتند از:

تغییرات در غشای پلاسمایی سلول، تغییرات در نفوذپذیری غشای پلاسمایی، تغییرات در نفوذپذیری غشای میتوکندری، فعالسازی کاسپازها و شکستگی‌های DNA سلولی.

شناسایی هر یک از این تغییرات به‌تنهایی یا ترکیبی از آن‌ها به وسیله ی فلوسایتومتری، امکان شناسایی و اندازه‌گیری سلول‌های آپوپتوتیک را از میان مخلوطی از سلول‌های دیگر فراهم می‌کند. همچنین اطلاعات با ارزشی در باره ی مسیر مولکولی مرگ سلول‌ها به‌دست می‌آید.

• آنالیز DNA، شناسایی سلول‌ها و ارزیابی فعالیت آنها

دسترسی به رنگ‌های فلورسانس که به صورت خطی و متناسب با غلظت به DNA سلولی متصل می‌شود، فلوسایتومتری را برای آنالیز DNA توانمند ساخته است. امروزه تعیین کمی مقدار DNA، شناسایی سلول‌های دیپلوئید نرمال در حالت استراحت، شناسایی سلول‌هایی که به طور فعال DNA سنتز می‌کنند و شناسایی سلول‌هایی که در مرحلهٔ پیش میتوز و یا میتوز هستند توسط فلوسایتومتر امکان‌پذیر شده است.

روش فلوسایتومتری در سایه ی افزایش روز افزون تعداد آنتی‌بادی‌ها، تترامرها (tetramers) و رنگ‌های تولید شده برای استفاده در ارزیابی فعالیت سلول‌ها به عنوان یک ابزار مهم در مطالعه ی سلول‌های سیستم ایمنی درآمده است. فلوسایتومتری چند رنگی این امکان را فراهم آورده است که انواع سلول‌های موجود در نمونه ی خون یا سلول‌های کشت‌شده به تفکیک مورد ارزیابی قرار گیرند. سلول‌های تحت مطالعه با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی معرف زیرگروه‌های سلولی، شناسایی می‌شود و خصوصیات رفتاری آنها نیز با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی (مثلاً ضد سایتوکین) و یا رنگ‌های ارزیابی‌کننده ی حیات سلولی تعیین می‌شود. با استفاده همزمان از دو روش آنالیز سلولی و جداساز سلولی امکان مطالعه بیشتر و کشت سلول‌های کاملا شناخته‌شده از نظر فنوتایپی یا رفتاری فراهم می‌شود.

برخی از منابع

۱–کتاب اصول فیزیکی دستگاه های آزمایشگاهی، دکتر داریوش شبهبازی گهرویی

۲–کتاب درآمدی بر فلوسایتومتری، اصول کلی و روش‌ها، دکتر محمدصادقی، دکتر ملک‌پور دکتر هادی کاظمی

۳–کتاب PAS، تکنیک‌های عملی در آزمایشگاه‌های تشخیصی جلد سوم: هماتولوژی بالینی، دکتر امیر سیدعلی مهبد.

1. CC Stewart J, Nicholson: Immunophenotyping. New York: John Wiley & Sons; 2000
2. Darzynkiewicz Z: Simultaneous analysis of cellular RNA and DNA content. Essential Cytometry Methods 2009:307
3. Longobardi GA: Flow cytometry: first principles. Edited by: New York: Wiley-Liss; 2001.
4. Khandpur RS. Handbook of Biomedical Instrumentation. McGraw-Hill Publishing Company Limited, New Delhi: India, 1987.