اصول فلوسیتومتری

در فلوسیتومتری، سلول های رنگ آمیزی شده (با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال متصل به رنگ فلورسنت و یا فلوروکرو مها) در یک جریان سیال قرار گرفته و به صورت تک تک از مقابل منبع نوری (لیزر) عبور می کنند. نور لیزر پس از برخورد به سلول یا در جهات مستقیم (forward scatter) و عمود بر محور تابش لیزر (side scatter) پراکنده شده و به آشکارساز می رسد و یا مربوط به فلوروکروم متصل به سطح ذره است که در این صورت فلوروکروم های متصل شده به سطح یا داخل سلول بر اثر تابش نور لیزر تحریک شده و انرژی نور تابیده شده را جذب کرده و سپس در طول موجی دیگری به صورت تابش فلورسنس آزاد می کنند. پراکندگی نور در زاویه های مختلف می تواند سلولها را بر اساس تفاوت در اندازه و پیچیدگی درونی از هم متمایز کند، در حالی که ساطع شدن نور فلورسنس از آنتی بادی نشاندارشده با فلورسنت می تواند سلول ها را بر اساس تفاوت در آنتی ژن های سطحی و سیتوپلاسمی از هم تفکیک نماید، بدین ترتیب سلول ها بر اساس خصوصیاتی نظیر حجم، گرانولاسیون و میزان اتصال ماده فلورسنس از هم افتراق داده می شوند؛ بنابراین دستگاه فلوسیتومتر نوع و میزان فلورسنس و همچنین مشخصات فیزیکی سلول مانند اندازه را بر مبنای مسیر پراکنده شدن پرتوهای نوری اندازه گیری می نماید .اگر سلول و یا ذره با یک یا چند رنگ فلورسنس (فلوروکروم یا فلوروفور) رنگ آمیزی شده باشد، پرتوهای نوری، این رنگ ها را برانگیخته و بدین شکل علاوه بر یافته های بدست آمده از اندازه و ساختار سلول، اطلاعاتی در ارتباط با فعالیت متابولیکی، محتوای DNA ، حضور شاخص های اختصاصی سطح و یا داخل سلول نیز حاصل خواهد آمد .اجزای دقیق نوری و الکترونیکی دستگاه فلوسیتومتر، سیگنال های فلورسنس و پرتوهای نوری پراکنده را توسط لنزهای مناسب جمع آوری نموده، سپس با استفاده از فیلترهای مناسب هر یک از سیگنال های نوری به سوی آشکارساز مناسب هدایت می شود. آشکارسازها سیگنال های نوری را به سیگنال های الکتریکی (متناسب با نور جمع آوری شده) تبدیل نموده و سپس سیگنال های اخیر توسط نرم افزار پردازش و آنالیز می گردد. البته بعضی از دستگاه های فلوسیتومتر مجهز به شناسایی و جداساز سلولها و ذرات نیز می باشند. (Flow cytometry activated Cell Sorting) (FACS) بعضی از این جداسازهای سلولی می توانند ۷۰ هزار سلول را در ثانیه شناسایی و در لوله های جداگانه جداسازی نمایند.

تمرکز هیدرودینامیکHydrodynamic Focusing

خصوصیت اصلی یک سیستم فلوسیتومتری این است که اندازه گیری ها بر روی نمونه های سلولی که در دستگاه جریان می یابند، انجام میشود. اگر از یک لوله جهت انتقال نمونه استفاده شود، سلول ها نمی توانند به طور مکرر به نقطه اندازه گیری محل برخورد لیزر به سلول بروند. اگر از لوله های باریک جهت اطمینان از انتقال تکرارپذیر سلول ها استفاده شود، احتمال دارد با عبور سلول های بزرگ تر مسیر بسته شود . برای حل این مشکل از روش تمرکز هیدرودینامیک Hydrodynamic Focusing کمک گرفته می شود .در این روش جریان آرامی از سلولها را به درون جریان مایع غلافی (Sheath fluid) وارد می کنند. مایع غلافی، سلول ها را در مرکز لوله متمرکز می کند، بنابراین سلول ها به طور منظم و به شکل منفرد به نقطه اندازه گیری منتقل می شوند .

فلوروکروم های مورد استفاده در فلوسیتومتری

تعداد فلوروکروم های مورد استفاده در فلوسیتومتری طی سالیان متمادی در حال افزایش بوده است . شناخت انواع فلوروکروم ها و آگاهی از مزایا و معایب آنها، تنها راه استفاده بهینه برای دستیابی به مقاصد علمی تحقیقاتی است. امروزه انواع مختلفی از فلوروکروم ها برای رنگ آمیزی سلول ها و اجزای داخلی آنها مورد استفاده قرار می گیرند. رایج ترین فلوروکروم هایی که در فلوسیتومتری استفاده می شوند، (Fluorescein Isothiocyanate FITC) و (Phycoerythrin PE) هستند. این رنگ های فلوئورسانس در محدوده ۴۸۸ nm طیف های جذبی دارند؛ بنابراین یک طول موج تحریکی لیزری می تواند این دو رنگ را تحریک کند. دستگاه های فلوسیتومتر اولیه قادر بودند فقط یک یا دو رنگ فلورسنس را مورد تجزیه و تحلیل قرار دهند، اما امروزه دستگاه هایی عرضه شده اند که می توانند هجده رنگ فلورسنس را به طور هم زمان شناسایی و پردازش نمایند. پیشرفت های همزمان در وسایل، تولید آنتی بادی های مونوکلونال، رنگ های فلورسنس، کامپیوتر و نرم افزار دریچه ی جدیدی را جهت استفاده از تکنیک فلوسیتومتری در آزمایشگاههای کلینیکی گشوده است.