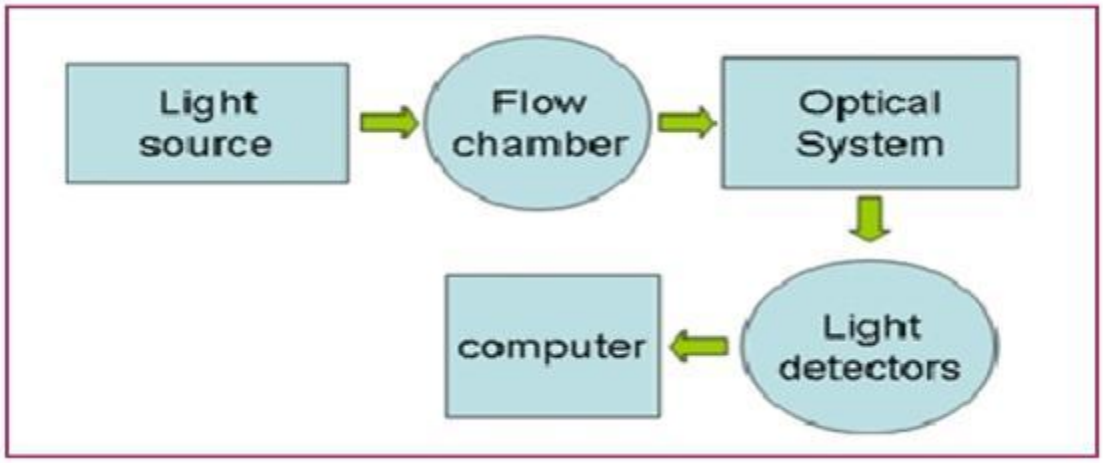
تکنیک فلوسایتومتری

مقدمه

سیتومتری یا یاخته سنجی به معنی تفکیک اجزا سلولی متعدد در یک نمونه است .دستگاه فلوسایتومتری اجزاء متعدد سلولی را تعیین کرده و همزمان مورد شمارش قرار می دهد در واقع فلوسیتومتری (Felorcent Activated Cell Sorting=FCM) تکنیکی برای شمارش و بررسی ذرات میکروسوپی مانند کروموزم ها و سلول ها هست که ذرات مورد آزمایش به صورت 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. غالباً حجم مورد نیاز از نمونه مورد آزمایش نیز خیلی کم و حدود ۱۰۰ میکرولیتر می‌باشد. در مورد دقت آن نیز باید گفت که قادر است تعداد ۱ سلول سرطانی در میان ۱۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ سلول عادی موجود در نمونهٔ مغز استخوان را شناسایی کند نام اصلی تکنیک فلوسیتومتری "پالس سیتوفتومتری" (آلمانی :Impulszytophotometrie) بود . در سال ۱۹۸۸ ،در کنفرانس مجمع مهندسان آمریکا در شهر فلوریدا ، نام آن به "فلوسیتومتری " تغییر یافت و به این صورت گسترش یافت .

فلوسیتومتری اجازه تجزیه و تحلیل هزار ذره را در هر ثانیه از نظر چندین پارامتر فیزیک و یا شیمیایی را می دهد.کاراکترهایی که توسط فلوسایتومتری قابل اندازه گیری هستند شامل اندازه سلول،پیچیدگی سیتوپلاسمی،محتوی DNA یا RNA سلول و طیف گسترده ای از پروتین های داخل سولی و متصل به غشا است. این روش بر خصوصیات پراکنده سازی نور توسط سلول ها و نیز بر نشر فلورسانس از آنها استوار است. نشر فلورسانس با استفاده مستقیم از مواد رنگ کننده فلورسنت حاصل می‌شود (مثل رنگ کننده‌های DNA یا RNA که هم خصوصیت فلورسانس بودن را دارا هستند و هم خود انتخاب می‌کنند که به کدام جزء سلولی متصل شوند) یا ترکیبی از رنگ فلورسنت با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال 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 کاملا 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 اگر چه سلول‌ها بخودی‌خود دارای فلورسانس اندکی در برخی طول موج ها هستند اما بدون بکارگیری نور تهییج کننده که غالباً لیزر می‌باشد هیچ سیگنالی تولید و به ردیاب‌های دستگاه ارسال نخواهد شد. سیگنال‌های ردیابی شده توسط دستگاه یا از منشاء نور لیزر دستگاه می‌باشد که پس از برخورد به سلول در جهات مستقیم (forward scatter) یا عمود بر محور تابش لیزر (side scatter) پراکنده شده و به ردیاب‌ها می‌رسد و یا از منشاء فلوروکروم متصل به سطح ذره می‌باشد. 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 می‌سازند در واقع سلول های رنگ امیزی شده (چه بوسیله منوکلونال انتی بادی متصل به فلوروسنت و چه فلوروکروم های متصل شونده به اجزاء سلولی)در یک جریان سیال قرار گرفته و به صورت تک تک از مقابل پرتوی نوری عبور میکنند و متعاقب ان نور پراکنده شده و نور فلوروسانس جانبی توسط اشکارسازها جمع اوری می شوند. این اشکار سازها سیگنال های نوری را به سیگنال های الکتریکی متناسب با نور جمع اوری شده تبدیل می کنند پراکنش نور در زاویه های مختلف می تواند سلول ها را بر اساس تفاوت در اندازه و پیچیدگی درونی از هم متمایز کند در حالی که ساطع شدن نور فلورسانس از انتی بادی نشاندار شده با فلورسنت می تواند سلول ها را بر اساس تفاوت در انتی ژن های سطحی و سیتوپلاسمی از هم تفکیک نماید.بدین ترتیب سلول ها را بر اساس خصوصیاتی نظیر سایز،گرانولاسیون،میزان رنگ پذیری از هم افتراق داده می شوند .



البته حائز اهمیت است که بدانیم فلوسایتومتری طوری طراحی نشده که به ما اندازه دقیق ذرات را بر حسب واحد ارائه دهد مگر اینکه از کالیبراسیون خارجی استفاده کنیم اما اختلافات و تفاوت های نسبی در این پارامترها را اشکار می سازد .

اولین دستگاه فلوسیتومتری بر اساس امپدانس با استفاده ازاصل کولتر در آمریکا رونمائی شد (حدود ۱۹۵۳ میلادی). اولین فلورسانس براساس دستگاه فلوسیتومتری در سال ۱۹٦۸ توسط ولفگانگ (Wolfgang Göhde) از دانشگاه مونستر و اولین استفاده تجاری از ان توسط یک شرکت آلمانی در سال های ٦۹/۱۹٦۸ انجام گرفت . در آن زمان ، استفاده از روش های جذب به طور گسترده مورد علاقه دانشمندان بود و هنوز فلوسیتومتری رواج پیدا نکرده بود . بلافاصله بعد از آن ،تکنیک و ابزرات فلوسیتومتری گسترش یافتند . شامل تولید Cytofluorograph در سال ۱۹۷۱ ، Pas8000 در سال ۱۹۷۳ توسط شرکت Partec ، اولین دستگاه FACS توسط شرکت Becton Dickinson در سال ۱۹۷٤ و ...

فلوسایتومترهای اولیه قادر بودند فقط یک یا دو رنگ فلورسانس را تجزیه و تحلیل کنند اما امروزه دستگاه‌هایی عرضه شده‌اند که قادرند یازده رنگ فلورسانس را به طور هم‌زمان ردیابی و تجزیه و تحلیل کنند. اساس و نحوهٔ کار فلوسایتومتر بحث پایه‌ای برای درک روش‌های مختلف فلوسایتومتری است.

در طول سالیان گذشته، ایمونوفنوتایپینگ توسط فلوسایتومتری، کمک بسیاری در تشخیص، طبقه بندی و پی گیری بعد از درمان سرطان های خون کرده است. امروزه اساس طبقه بندی بدخیمی های خون بر پایه خصوصیات طبیعی سلول های رده های مختلف در مراحل بلوغ می باشد. ایمونوفنوتایپینگ توسط فلوسایتومتری روشی سریع و آسان است. این روش با خصوصیت منحصر به فردی که دارد، سلول های مختلف را بر اساس آنالیز چند پارامتری تشخیص می دهد.

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 امکان‌پذیر است. همچنین این روش در تشخیص بیماری‌ها، تعیین پیش آگهی و هم برای ارزیابی درمان بدخیمی‌ها کاربرد دارد. فلوسایتومترهای کلینیکی معمولاً برای استفادهٔآزمایشگاه‌های کلینیکی تنظیم شده است، اما بعضی از آنها ظرفیت جداسازی(Sorting) انتخابی سلول‌ها را دارا می‌باشند که در کارهای تحقیقاتی مورد استفاده هستند. پیشرفت‌های هم زمان 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، مجموعه ای از فن آوری های گوناگون برای سنجش سلول ها و بررسی ساختمان و محتوی درونی آن ها 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 ۱۸-۱۰*۱ گرم رنگ به ازای هر سلول است. بدین مفهوم که اگر یک گرم رنگ در حجمی به ابعاد m300 * Km 3000 * Km3000 حل شود، دستگاه قادر به تشخیص آن می باشد.فلوسیتومترهای امروزی قادرند تا هزار ذره را در یک ثانیه بررسی کنند که به انها "Real time" میگویند . این دستگاه ها میتوانند ذرات را بر اساس ویژگی های خاص ایزوله و آنالیز کنند . یک دستگاه فلوسیتومتری شبیه میکروسکوپ است به این تفاوت که به جای تولید یک تصویر از سلول ، دارای توانایی عملکردی بسیار بالا است و خودکار بر اساس پارامتر ها سلول ها را شمارش می کند . برای تجزیه و تحلیل بافت جامد باید سوسپانسیونی تک سلولی از بافت تهیه کنیم .

بسیاری از فلوسایتومترهای امروزی شامل ترکیبی از مدارهای دیجیتال و آنالوگ جهت اندازه گیری فوتون های رسیده از ذرات عبوری از پرتو لیزرهستند. چون این فوتون ها با سایر فوتون های غیر مرتبط با نمونه همراهند برای رسیدن به نسبت سیگنال به نویز بالا باید از فیلتر جهت نویزهای نوری استفاده کرد. فیلتر مضاعفی نیز جهت کاهش نویز الکترونیکی دستگاه ها استفاده می شود. جهت کاهش دریافت نویز محیطی، از پنجره دریافت با پهنای قابل تنظیم استفاده می شود. پس از دیجیتال‌کردن داده ها، جبران سازی رنگی با استفاده از وارون ماتریس جبری خطی انجام می گیرد و از جداول جستجو جهت تبدیل خطی به لگاریتمی استفاده می شود.

پیشرفت های زیاد در طراحی این دستگاه و اتوماتیک کردن آن نشان داده است که ، بدون کنترل شدید و کالیبره دقیق، داده های نادرستی به دست می آیند . برای کاهش این احتمال،باید طراحان این دستگاه ها با همکاران متخصص بیولوژیست، شیمی‌دان و پزشکی خود برای توسعه و بهبود عملکرد این دستگاه ها مشورت و همکاری کنند.

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 علی رغم 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 ٦٠ میلادی تلاش جمعی از دانشمندان در زمینه‌های مختلف منجر به ابداع تکنیک فلوسایتومتری گردید، که این تکنیک در زمینه بر طرف نمودن مشکلات فوق از توانایی های خاصی برخوردار است.

کاربردها و مزایا

هر سلولی بر حسب نوع و تخصصی که به عهده دارد مولکول‌های مختص به خود را بیان می‌کند، بدین معنی که همۀ ژن‌ها در همۀ سلول‌ها بیان نمی‌شوند بلکه برحسب وظیفه‌ای که در طی تمایز بر عهدۀ 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. مثلا 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 (CD34 مارکر اختصاصی سلول‌های ریشه‌ای تمایز نیافته مغز استخوان می‌باشد).

با استفاده از فلوسایتومتری محصولات پروتئینی ژن‌ها در داخل سلول نیز قابل ردیابی هستند و نامگذاری آنتی‌بادی‌های مورد استفاده براساس نام پروتئین مورد نظر صورت می‌گیرد. مثلاً پروتئین Zap-70 ساروگیت مارکر برای موتاسیون‌های ناحیه متغیر زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین می‌باشد و در تعیین زیر گروه‌های CLL اهمیت دارد و توسط آنتی بادی با همین نام قابل شناسایی است.

آپوپتوز یکی از شکل‌های مرگ سلول می‌باشد 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 می‌باشند این نشانه‌ها عبارتند از تغییرات در غشاء پلاسمائی سلول، تغییرات در نفوذپذیری غشاء پلاسمائی، تغییرات در نفوذپذیری غشاء میتوکندری، فعال‌سازی کاسپازها و شکستگی‌های DNA سلولی. شناسایی هر یک از این تغییرات به تنهایی یا ترکیبی از آنها به وسیلهٔ فلوسایتومتری، امکان شناسایی و اندازه‌گیری سلول‌های آپوپتوتیک را از میان مخلوطی از سلول‌های دیگر فراهم می‌کند همچنین اطلاعات با ارزشی در بارهٔ مسیر مولکولی مرگ سلول‌ها به دست می‌آید.

دسترسی به رنگ‌های فلورسنتی که به صورت خطی و متناسب با غلظت به DNA سلولی متصل می‌شوند فلوسایتومتری را برای آنالیزDNA 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 امکان پذیر شده است. هنگامی که فازهای مختلف چرخهٔ زندگی سلول‌ها مشخص شدند، می‌توان با توام‌کردن روش‌های ردیابی پروتئین‌های مؤثر در چرخهٔ سلولی به وسیلهٔ آنتی‌بادی‌های اختصاصی و روش تعیین مقدار DNA بیان پروتئین‌ها را در فازهای مختلف زندگی سلول‌ها بررسی کرد. اضافه‌نمودن آنالوگ تیمیدین یا بروموداکسی یوریدین به محیط کشت سلولی امکان شناسایی سلول‌هایی را فراهم می‌کند که فعالانه در حال سنتز DNA هستند. با استفاده از روش تعیین مقدار DNA همچنین می‌توان تعداد کروموزوم‌ها (هنجار یا ناهنجار) را مشخص کرد. سلول‌هایی که به حالت پلوئیدی (برای مثال در مگاکاریوسیت‌ها) و یا آناپلوئیدی (برای مثال در بیماری‌های بدخیم) می‌باشند نیز با این روش قابل شناسایی هستند.

. روش فلوسایتومتری در سایهٔ افزایش روزافزون 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 زیر گروه‌های سلولی، شناسایی می‌شوند و خصوصیات رفتاری آنها نیز با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی (مثلاً ضد سایتوکین) و یا رنگ‌های ارزیابی کنندهٔ حیات سلولی تعیین می‌شوند. 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.

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 برهمکنش 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 (bioactive) 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. روشی که آنها به کار بردندFluorescence Activated Cell Sorting یا به طور خلاصه FACS نامیده شد. جداسازهای جریانی (flow sorter) وسایلی ضروری و پرطرفدار در علوم بیولوژیکی و علوم دیگر هستند. کارآیی اصلی این جداسازها، چنانچه از نامشان بر می‌آید، 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 توسط flow sorter از دیگر سلول‌های همراه جدا کرد.

کاربردهای فلوسایتومتری به طور خلاصه:

۱: ساده ترین و فراوانترین کاری که می توان با فلوسایتومتری انجام داد تشخیص فنوتیپ سلول با استفاده از مارکر های سطح سلولی است. علاوه بر بیان یک ماکر میزان بیان آن مارکر را نیز می توان تعیین کرد.

۲: اندازه گیری بیان یک ماده در سلول مثل IL-12 در درون سلول.

برای تعیین میزان اینترلوکین با روش الایزا ، تنها می توان میزان آن را در سوپرناتانت محیط کشت اندازه گرفت و دیگر نمی توان تعیین کرد که کدام یک از رده های سلولی میزان بیشتر و کدام رده میزان کمتری تولید کرده اند . اما با روش فلوسایتومتری ، اگر از فلو دو رنگ استفاده کنیم (یک انتی بادی علیهCD4 و یکی علیه IL-17) می توان تعیین کرد که کدام رده ی سلولی بیشتر وکدام میزان کمتری اینترلوکین تولید کرده اند.

۳: با کمک فلوسایتومتری می توان سیکل سلول و میزان تکثیر سلولی را نیز اندازه گرفت. (چون در طی تکثیر سلولی میزان DNA زیاد می شود .

چندین رنگ فلور سنت وجود دارند که قابلیت اتصال به DNA را دارند. مهمترین ان ها که کاربرد گسترده ای دارد پروپیدیوم یدید است (PI . (PI در بین زنجیره های دو رشته ای اسید نوکلیک قرار می گیرد و توسط لیزر آرگون در طول موج ٤٨٨ nm تحریک می شود و نور فلورسانس قرمز را از خود پراکنده می سازد و چون از ورود این رنگ توسط سلول های زنده به داخل جلوگیری می شود ، یک راه تشخیص سلول های زنده از مرده ، استفاده از همین نوع رنگ است.

٤: میزان RNA : محتوای DNA و RNA را می توان به طور هم زمان در سلول هایی که نفوذ پذیر شده اندبا نشان دار کردن آن ها به وسیله ی آکریدین نارنجی Acridin orange (AO) اندازه گیری نمود.

٥: میزان پروتئین : با استفاده از آنتی بادی های اختصاصی نشان دار میتوان پروتئین مورد نظر را اندازه گیری کرد. محتوای کل پروتئین سلول را می توان با رنگامیزی سلول های فیکس شده تخمین زد. این رنگها می توانند SulfoRodamin 110 ویا FITC باشند.

٦: تعیین فعالیت آنـزیم هـای درون سـلولی: یکـی از کاربردهـای فلوسـایتومتری تعیـین کینتیـک آنـزیم هـای داخـل سـلولی اسـت. مـثلا برای تعیین فعالیت پروتئازی ، رودامـین بـه سوبسـتراهای پپتیـد هـای مختلـف مـی چسـبد کـه بـا فعالیـت پروتئـازی ایـن رودامـین آزاد می شود و از این طریق می توان فعالیت پروتئازی را اندازه گرفت.

۷: قابلیت نفوذپذیری غشا: تغییـرات نفوذپـذیری غشـا را مـی تـوان بـا اسـتفاده از رنـگ هـای کـه بـه DNA متصـل مـی شـوند بررسـی نمـود کئـل اتیـدیوم بروماید EB ،SYTO ،PI ، Yo-PRO و بعضـی از ایـن رنـگ هـا در سـلول سـالم و دسـت نخـورده بـه علـت فعالیـت غشای سلولی نمی توانند وارد شوند که در صورت ورود به سلول نشان دهنده ی افزایش قابلیت نفوذ غشا هستند.

از دیگـر کـاربرد هـای فلوسـایتومتری مطالعـه ی اکسـیداتیوهای داخـل سـلولی و سـنجش PH داخـل سـلولی و آنـالیز و جداسـازی کرومـوزوم هـا ، مـرگ برنامـه ریـزی شـده ی سـلول ، تشـخیص تومـور، کنتـرل پیونـد اعضـا، تشـخیص بـاکتری، شناسـایی اسـپور قارچ/پروتوزوئرها/ ویروس / آزمون اثرداروها، میکربیولوژی موادغذایی، داروسازی، تعیین جنسیت سلول است.

مزایای روش فلوسایتومتری:

۱- بررسی چندین خاصیت سلول بطور همزمان.(سایز ،گرانولوسیتی...)

۲ -عینی بودن Objective

3- سرعت عمل زیاد که بررسی تعداد زیادی سلول را ممکن می‌سازد (10^{5}*۱سلول در هر دقیقه)

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

٥- توانایی مطالعهٔ سلول‌های زندهٔ فیکس نشده

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

.اصل فلو سایتومتری بر اساس فلورسنت است (مانند میکروسکوپ فلورسنت).

اما فلوسایتومتری نسبت به میکروسـکوپ فلورسـنت محاسـنی دارد از جملـه اینکـه خـود دسـتگاه اطلاعـات آمـاری مـی دهـد، سـلول هـا شمارش می شوند ، مـی تـوان سـلول زنـده را بررسـی کـرد ، درمـدت زمـان کوتـاهی مـی تـوان اطلاعـات مـورد نظـر را بدسـت آورد، در مورد بررسی میزان بیان یـک مـارکر (کـم یـا زیـاد بـودن آن در هـر سـلول) در میکروسـکوپ فلورسـنت بـه صـورت کیفـی(+⟵ ++++) بیـان میشـود امـا اختلافـات کوچـک فلورسـنت در دسـتگاه فلوسـایتومتر بـه طـور دقیـق بـه صـورت عـددی نشـان داده مـی شـود. و اینکـه میکروسـکوپ فلورسـنت user develope اسـت و بـه تشـخیص فـرد کـاربر بسـتگی دارد. در مقابـل، فلوسـایتومتری دارای مزایای زیر است:

از آنجا که بررسی روی تک سلول ها انجام می‌گیـرد نـا یکنـواختی نمونـه قابـل بررسـی و کمـی‌سـازی اسـت. ایـن امـر بـه ویـژه بـرای سلول های با منشا طبیعی اهمیت بیشتری پیدا می‌کند.

PMT مـورد استفـاده در فلـوسـایتـومتـری جهت تمیز سطوح مختلف رنگی بسیار بهتر از چشم انسان عمل می کند.

اجزا و نحوه عملکرد

دستگاه فلوسیتومتری دارای ۵ جزء اصلی است :

- جریان سلولی (flow cell) : جریان مایع (مایع شیث)، که سلول های نمونه را حمل و صف بندی می کند تا یکی یکی از مقابل پرتو نور لیزر عبور کنند .

- سیستم اندازه گیری : به طور معمول برای اندازه گیر امپدانس مورد استفاده قرار می گیرد .

- سیستم نوری : لامپ (جیوه یا زنون) ، لیزر خنک کننده آبی با قدرت زیاد (لیزری که توسط سیستم ابی خنک می شوند) (آرگون ، کریپتون ، لیزر رنگی) ، لیزر خنک کننده آبی با قدرت کم (آرگون ٤٨٨ نانومتر)، لیزر قرمز633) HeNe نانومتر) ، سبز HeNe، لیزر HeCd (اشعه ماورای بنفش UV) ، لیزر دیودی (آبی ، سبز ، قرمز ، بنفش) جز سیستم نوری فلوسیتومترهستند که در سیگنال نوری تکنیک کاربرد دارند .

- سیستم ADC (تبدیل کننده سیستم آنالوگ به دیجیتال) که سیگنال های نوری اسکترهای جلو و پهلویی و همچنین سیگنال های فلورسنت را به سیگنال های الکترونیکی که قابل شناسایی با کامپیوتر هستند ، تبدیل میکند .

- سیستم تقویت کننده خطی یا لگاریتمی

رایانه برای آنالیز سیگنال ها

جریان مایع

خصوصیت اصلی یک سیستم فلوسایتومتر این است که اندازه گیری ها برای نمونه‌های سلولی که در دستگاه جریان می یابند انجام می گیرند. اگر به طور ساده از یک لوله جهت انتقال نمونه استفاده کنیم سلول ها نمی توانند به طور مکرر به نقطه اندازه گیری (محل برخورد لیزر به سلول) بروند.

اگر از لوله های باریک تر جهت اطمینان از انتقال تکرار پذیر سلول ها استفاده شود احتمال دارد با عبور سلول های بزرگتر منجر به بسته شدن مسیر شوند. برای حل این مشکل از روش کانونی هیدرودینامیک(Hydrodynamic Focousing)استفاده می شود. در این روش جریان آرامی از سلول ها را به‌درون جریان حامل سریع، وارد می کنند. مایع حامل، سلول ها را در مرکز لوله متمرکز می کند ، بنابراین سلول ها به طور تکرار پذیری ب و در سک ردیف در مسیر مجازی به نقطه اندازه گیری منتقل می شوند.

سیستم نوری

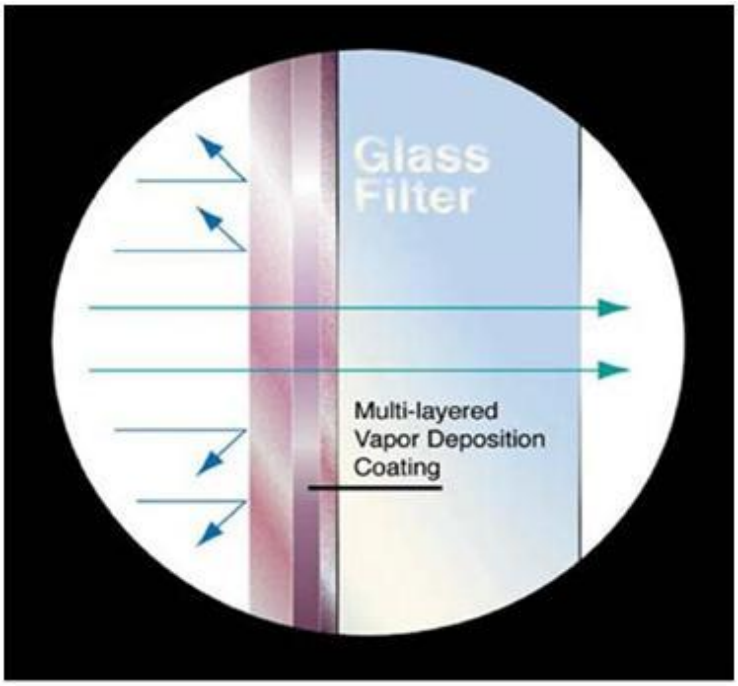
سیستم اپتیکی فلوسایتومتر متشکل از یک یا چند منبع نوری به همراه یک سری از عدسی ها، فیلترها و آشکارسازها است. عدسی ها و فیلترها جهت انتقال نور منبع به نقطه اندازه گیری و نیز برای انتقال نور پراکنده و فلورسانس از نقطه اندازه گیری به آشکارسازها به کار می روند. انواع مختلفی از منابع نوری برای فلوسایتومترها وجود دارند که به شرح زیرهستند:

لیزر: لیزرها دارای این مزیت هستند که منبع نور تک رنگ-تک طول موج هستند. این موضوع در جداسازی نور پراکنده از نور فلورسانس به ما کمک می کند.

پرکاربردترین لیزرها لیزر یون آرگون با طول موج ٤٨٨ نانومتر و لیزر He-Ne با طول موج قرمز ٦٣٣ نانومتر هستند.

لیزرهای دیودی نیز به دلیل پایداری و قیمت ارزان مورد استفاده قرار می گیرند و معمولاً طول موج ٦٣٥ نانومتر استفاده می شود.

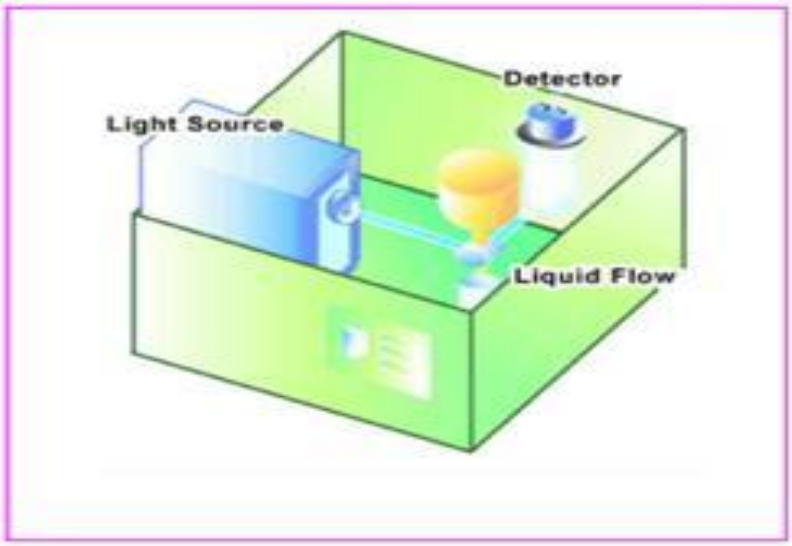
لامپ های قوسی: بر خلاف لیزرها نور سفید دارند و نور محرک با استفاده از فیلتر انتخاب می شود. معمولا لامپ های Xe و جیوه بیشتر به کار می روند.



فیلترها

فیلترهای نوری فقط طول موج های خاصی را عبور داده و مانع عبور سایر طول موج ها می شوند. دو نوع فیلتر اصلی مورد استفاده در فلوسایتومتری در شکل ۱ نشان داده شده اند. فیلترهای dichroic یا دو رنگ نما و فیلتر باند عبوری. فیلترهای dichroic یا دو رنگ نما آینه های انتخابی هستند که اجازه عبور طول موج های بلند را می دهند و طول موج های کوتاه را منعکس می کنند. فیلتر باند عبوری جهت عبور باند باریکی از طول موج

بین 640-620 nm طراحی شده است. در شکل ۲ شمای کلی از یک سیستم فلوسایتومتری شاهد می شود. در این شکل مجموعه زیادی از فیلترها برای جداسازی نورهای حاصله به باندهایی که بیانگر پراکندگی توسط سلول و فلورسانس ناشی از ترکیبات مختلف آن ها است به کار رفته‌اند.



آشکارسازها

با عبور ذرات یا سلول ها از مقابل پرتو لیزری در فلوسایتومتر، مولکول های فلورسانس سطح سلول فوتون هایی با طول موج خاص در همه جهات تابش می کنند. سیستم اپتیکی سیتومتر بخشی از این فوتون‌ها را به آشکارسازها می رسانند.

فلوسایتومتری اساسا اندازه گیری هایی را انجام می دهد که قبلا توسط میکروسکوپ فلورسانس انجام می شده است. ولی روش میکروسکوپی قدیمی دارای اشکالات متعددی است که برخی از آن‌ها عبارتند از:

روش پر زحمت و کندی است. به طور عملی با این روش می توان در دقیقه حدود ۱۰۰ سلول یا بیشتر را شمارش کرد اما اگر اندازه‌گیری های بیشتری نیاز باشد نیاز به صرف وقت زیادی است.

تجزیه و تحلیل میکروسکوپی نمونه ها با چشم باعث خستگی اپراتور شده که بر صحت نتایج اثر می گذارد.

در نتیجه مشکلات فوق معمولا سلول‌های کمی قابل آنالیز هستند. این امر اثر معکوسی بر خطای آماری به دست آمده دارد.

آنالیز میکروسکوپی غالبا کیفی است و در بهترین حالت نیمه کمی است. مثلا می‌توان بین سلول های رنگ آمیزی نشده و سلول های با رنگ قرمز تمییز داد اما در تعیین شدت رنگ ها نمی توان اظهار نظری کرد.

دقت روش میکروسکوپی بسیار وابسته به اپراتور است.

الکترونیک فلوسایتومتر

فلوسایتومترها از زمان ساخته شدن اولین دستگاه تجاری در ۳۰ سال پیش پیشرفت سریعی داشتند. این سیتومترها کاملا خودکار نبوده اند به طوری که اپراتور برای کار کردن می‌بایست به بخش های مختلف دستگاه از نظر علمی آگاهی داشته باشد. اما بهبود سرعت بخش های مختلف الکترونیکی، کاهش ابعاد و مصرف انرژی کم باعث افزایش سرعت و حساسیت بیشتر این دستگاه ها شده است. اتوماتیک کردن فرایندهای پیچیده ای که قبلا نیاز به اطلاعات زیادی داشت باعث افزایش بیشتر کاربرد آن و نیز استفاده کاربران بیشتری از آن شده است.

می توان فلوسایتومتری را دهکده ای تصور کرد که اعضای این دهکده با زبان های کاملا متفاوت از هم مثل اپتیک، مکانیک سیالات، بیولوژی، شیمی، بیوشیمی، الکترونیک و آمار ریاضی صحبت می کنند که هر کدام از این ها شاخه ای از علم و تخصص ویژه ای در دنیای امروز هستند. اگر به یک فلوسایتومتر قدیمی نگاه کنید آنچه که می بینید غالبا وابسته به سیالات است که شامل: شیر یا دریچه، سوپاپ تنظیم، شستی ها و پیچ های متعدد، شاخص یا صفحه عقربه دار، لوله ها و ... هستند. ولی آنچه که امروزه درون یک دستگاه فلوسایتومتر دیده می شود غالبا بخش های الکترونیکی هستند. در این مقاله به بخش‌های مختلف الکترونیکی یک سیستم فلوسایتومتر مدرن و نحوه عملکردشان توجه شده است.بخش الکترونیک دستگاه به سه قسمت اصلی تقسیم می شود که عبارتند از: الکترونیک بخش آشکارسازی، مدارهای اندازه گیری و مدارهای محاسباتی.بلوک دیاگرام بخش های مختلف الکترونیکی یک فلوسایتومتر به شرح زیر است:

۱- الکترونیک بخش آشکارسازی

ما از لغت الکترونیک آشکارساز استفاده کرده ایم تا مدارهایی را که عملکرد signal conditioning دارند، مانند: تغییرات فوتون به فوتوالکترون، تبدیلات جریان به ولتاژ، ذخیره سازی baseline، تقویت کننده، DC restoration و تمایز یا discrimination را توصیف کنیم. مشکل اندازه گیری به ویژه برای فلورسانس کم نور و میرا این است که اندازه گیری ها باید در محیطی پر از نویز، نویزهای اپتیکی و الکترونیکی، انجام گیرند. وقتی سیگنال کوچکی روی نویز زمینه بالا قرار می گیرد، تغییرات سیگنال زمینه دقت اندازه گیری سیگنال های اصلی کوچک را محدود می کنند. روی هم رفته، محدودیت آشکارسازی سیگنال های کوچک توسط خطای نویز زمینه تعیین می شود. وظیفه الکترونیک آشکارساز این است که نسبت سیگنال به نویز را در اندازه گیری به بیشترین مقدار ممکن برساند.

آشکارسازها

از آنجا که آنچه که در فلوسایتومتر اندازه‌گیری می شود نور با طول موج های مختلف است، فوتودیودها(PDs) و PMTs بخاطر 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 می شود. در حالی که بازده فوتودیودها در تبدیل نور به فوتوالکترون بیشتر از PMTs هستند، حساسیت PMTs به دلیل بهره زیاد داخلی آن‌ها بیشتر ازPDs است. PMTs مورد استفاده در فلوسایتومترها دارای بهره نویز پایین در حد ۱۰ به هزار یا میلیون یا بیشتر هستند. بهره یک PMT پایین ترین بهره نویز ممکن برای دستگاه است، زیرا جریان الکترون های PMT درون خلا اتفاق می افتد. شار الکترونی درون تقویت کننده در ماده جامد، فلز یا نیمه رسانا، اتفاق می افتد به طوری که گرمای تصادفی ایجاد شده ناشی از این حرکت باعث ارتعاش اتم ها و مولکول ها می شود که به این حالت تصادفی نویز گفته می‌شود.

تقویت کننده (trans-impedance)

آشکارسازهای PD و PMT در پاسخ به ورودی فوتون های نوری جریان یا شار الکترون تولید می کنند. به دلیل این که سیستم های الکترونیکی ولتاژ را اندازه گیری و مقایسه می کنند باید خروجی دتکتور به ولتاژ تبدیل شود. تبدیل جریان به ولتاژ با عبور جریان یا شار الکتریکی از یک مقاومت انجام می گیرد. آنچه که اتفاق می افتد بر اساس قانون اهم قابل پیش‌بینی

است: ولتاژ تولید شده برابر حاصلضرب جریان در مقاومت است و چون مقدار مقاومت ثابت است ولتاژ خروجی مستقیما متناسب با جریان ورودی است. مدار الکترونیکی که این تبدیل را انجام می دهد تقویت کننده trans-impedance نام دارد که می‌تواند در مدار بخش PMT جاسازی شود. این مدار جریان فوتوالکترون ها را به ولتاژ تبدیل کرده و تقویت خطی ولتاژ را فراهم می کند.

ذخیره و بازیابی کننده خط پایه

PDها و PMT ها آنقدر حساس هستند که اگر خروجی آن‌ها را، در حالتی که هیچ نوری به بخش حساس داخل آن‌ها نمی رسد، بررسی کنیم. قطاری از پالس های سطح پایین آشکار می‌شوند که توسط تابش‌های ترمویونیک ایجاد شده و به جریان تاریکی معروفند. این پالس ها ناشی از الکترون های تولید شده توسط دمای محیط در فوتوکاتد درون PMT هستند. اگر آشکارساز سرد نگه داشته شوند آهنگ این پالس‌ها کاهش می یابند. علاوه بر جریان تاریکی نورهای سرگردانی نیز هستند که به آشکارساز می رسند که بر مکان جمعیت منفی در هیستوگرام اثر می گذارند. این نور می تواند ناشی از پراکندگی رامان Raman ناشی از درخشش فیلامان ملتهب و لوله لیزر حاوی فیلتر نوری باشد یا حتی می تواند ناشی از نور فلورسانس مایع باشد. این منابع نویز اثر نامناسبی بر سیگنال های سطح پایین دارند و به طور مؤثر اندازه پالس را به شکل غیرخطی افزایش می دهند، بنابراین باید از سیگنال اصلی در مدار اندازه گیری کم شوند. این عمل توسط مدار بازیابی base line انجام می‌شود. این مدار مانند یک فیلتر پایین گذر عمل می کند و بخش جریان های DC نور سرگردان را حذف می کند.

مجزاگر یا تریگر

برای اندازه گیری دقیق فوتون‌های رسیده از نمونه، وقتی که نمونه آماده است باید اندازه گیری شروع شود. برای تشخیص آماده بودن نمونه از حد آستانه یکی از پارامترهای مورد اندازه پارامتر مجزاگر یا تریگر استفاده می شود.

اگر هدف اندازه گیری ایمونوفلورسانس باشد پارامتر مجزاگر معمولا نور پراکنده به جلو به جای فلورسانس است زیرا تمامی سلول ها درجه ای از پراکندگی نوری را ایجاد می کنند باید قادر به اندازه گیری فلورسانس ناشی از تمامی سلول ها، باشیم. به طور معکوس اگر هدف اندازه گیری محتویات DNA سلولی باشد؛ معمولا پارامتر فلورسانس DNA به عنوان مجزاگر انتخاب می شود زیرا معمولا فلورسانس رنگی DNA سلول های بدون هسته مورد توجه نیستند. حد آستانه پارامتر مجزاگر بسته به نوع کاربرد انتخاب می شود، به طوری که هرگاه خروجی آشکارساز پارامتر مجزاگر بیشتر از حد آستانه شود ذخیره سازی و تجمع سیگنال شروع می شود. هرگاه خروجی آشکارساز کمتر از حد آستانه پارامتر مجزاگر شود عمل جمع آوری سیگنال ها به پایان می رسد. تنظیم حد آستانه مجزاگر از نقطه نظر اپراتور مهمترین قسمت راه اندازی فلوسایتومتر است زیرا دستگاه می تواند فقط داده‌هایی را جمع آوری کند که مقدار پارامتر مجزاگر آن بیشتر از حد آستانه باشد.

تقویت کننده

مدار دیگری که در انتهای دیگر سیستم الکترونیکی وجود دارد تقویت کننده بهره قابل برنامه ریزی است. تقویت کننده انتقال سیگنال های کوچک را به جایی که اندازه‌گیری قابل انجام است فراهم می کند. هر چند تقویت کننده ها دارای سطح نویز ذاتی بوده که می تواند در شرایط بهره بالا نسبت سیگنال به نویز را کاهش دهد. به این دلیل افزایش بهره و ولتاژ PMT جهت تقویت سیگنال بهتر از بهره تقویت کننده است.

توصیف خصوصیات پالس: سیگنال های انتگرال و قله

اندازه گیری ارتفاع پالس معمولا جهت اندازه گیری نور پراکنده یا شدت فلورسانس ذرات کوچک تا وقتی که قطر ذره به وضوح کمتر از قطر عمودی پرتو لیزر باشد، کافی است. هرچند اگر قطر ذره مشابه یا بزرگتر از پرتو لیزر شود ذره نمی تواند در یک لحظه به طور کامل تابش کند به علاوه فوتون های تابشی غالبا در ابتدا ناشی از لبه ورودی ذره، وسط و سپس کناره دیگر مسیر عبور ذره از راه پرتو لیزر هستند. به همین دلیل تعداد فوتوالکترون های لحظه ای جمع آوری شده باید در کل عرض پالس با یکدیگر جمع شوند. این فرایند که انتگرالگیری نام دارد کمی سازی نور پراکنده و شدت فلورسانس ذرات بزرگ تر را فراهم می کند.

انتگرال گیر

در فلوسایتومترهای امروزی انتگرال گیری توسط تقویت کننده هایی انجام می گیرد که باند عبوری پایین داشته که توسط فیلتر پایین گذر الکترونیکی محدود می شوند. هرگاه ذره از پرتو لیزر عبور کند خروجی تقویت کننده آنقدر آهسته افزایش می یابد که خروجی آن واقعا انتگرال پالس اصلی تا مقدار قله آناست. انتگرال گیری غیر فعال به سمت انتگرال گیری فعال سوق داده می شود به طوری که سوئیچ های سریع مسئول عمل تریگر هستند و بار خازن را کنترل می کنند. بار کل روی خازن در انتهای هر بار اشباع مجزاگر باید دقیقاً متناسب با سطح زیر منحنی باشد.

آشکارسازی همزمان

یکی از مشکلات عمده در فلوسایتومتری وجود دوتایی ها یا حتی تجمع بیش از حد نمونه است. در سیتومتری استاتیک مثل میکروسکوپ نوری؛ چشم مشکلی جهت تمیز دادن یک سلول قرمز و یک سلول سبز در روبروی همدیگر بر روی اسلاید ندارد. هرچند در فلوسایتومتری که در هر ثانیه هزاران سلول ازپرتو لیزر عبور می کنند، سلول های سبز که بلافاصله پس از سلول قرمز می آیند می توانند به عنوان یک سلول سبز و قرمز، مثبت دوگانه، شمارش شوند. برای به حداقل رساندن این احتمال اپراتور، قله یا ارتفاع پارامتر مجزاگر را انتخاب می کند زیرا در قله زمان افزایش و کاهش سریعی دارد بنا براین به مجزاگر اجازه می دهد تا در حد کمتر از حد آستانه بین دو سلول نزدیک به هم قرار بگیرد.

۲- الکترونیک اندازه گیری

الکترونیک اندازه گیری ولتاژهای آنالوگ را به عدد تبدیل می کند که رقمی کردن نام دارد. کارخانجات مختلف سازنده فلوسایتومتر این عمل را به روش های مختلفی انجام می دهند اما نتیجه نهایی آن ها یکسان است: نمونه در نهایت با مقادیر دیجیتالی نمایش داده می شوند (یک فایل list mode) به طوری که توسط کامپیوتر قابل آنالیز و تجزیه و تحلیل هستند. داده های دیجیتالی دارای مزایایی هستند زیرا تمام اعمالی که روی داده های دیجیتالی انجام می گیرد بسیار سریع تر انجام می گیرد. انتقال بازیابی یا آرشیوی مثل تبدیل scale خطی به لگاریتمی، جبران سازی فلورسانس، پنجره سازی و ... همگی به طور کلی با دقت و سرعت بالایی روی داده های دیجیتالی انجام پذیر هستند.

مدارهای Peak Sample-and-Hold

اولین گام در فرایند اندازه گیری در یک زمان منظم کردن تمامی مقادیر قابل دیجیتال است. برخی از این مقادیر ممکن است قله بوده و برخی پهنای پالس و برخی دیگر سطح زیر منحنی باشند این امر می تواند مشکل زمانی برای فرایند اندازه گیری های بعدی فراهم کند. تمامی داده‌ها در قله سیگنال در ارتفاع پالس قرار دارند. می توان از آنچه که در قله پالس پس از بالاترین نقطه پالس است صرفنظر کرد و اندازه گیری های کاملا معتبری به دست آورد. برای دیجیتالی کردن تمامی مقدار جمع آوری شده ، قله، پهنا و انتگرال ، باید مقادیر آن ها را تا زمانی که به بیشترین مقدار خود می‌رسند ذخیره کنیم.Peak Sample-and-Hold یا مدارهای پالس کشیده این عمل را انجام می‌دهند. آن ها مقادیر تمام پارامترهای جمع‌آوری شده را تا زمانی که دیجیتالی شوند ذخیره می کنند. دستگاه های مدرن امروزی دارای چندین لایه مدار Sample-and-Hold بوده که پالس ها را به شکل لوله ای عبور می‌دهند ،بنابراین در حالی که پالس های قبلی اندازه گیری شده اند سلول های جدید رسیده برای شمارش از دست نمی روند.

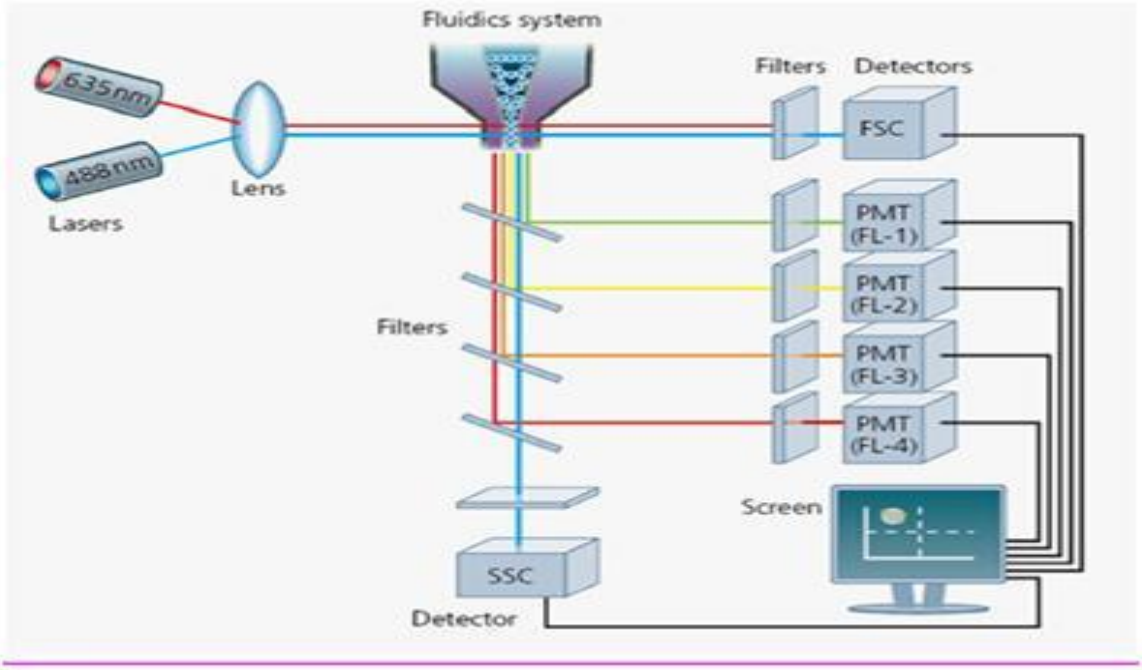
مبدل AD

در سال ۱۹۷۵ نشان داده شده است که اگر فرکانس نمونه برداری به اندازه کافی بزرگ باشد نمونه های دیجیتالی مجزا با استفاده از تابع کلی درونیابی می توانند با هم ترکیب شده و یک سیگنال آنالوگ پیوسته تشکیل دهند. وظیفه ADC ها عمل دیجیتالی کردن است یعنی تبدیل ولتاژهای آنالوگ، معمولاً بین صفر تا چند ولت، به مقادیر مجزای دیجیتالی(۰و۱) امروزه بیشترین بحث اصلی روی مزایای دیجیتالی کردن مستقیم پالس بلافاصله پس از تقویت کننده به جای استفاده از مدار انتگرال گیر و مدار peak sample and hold و سپس دیجیتالی کردن داده های ذخیره شده است. تفاوت بین این دو روش این است که در روش دیجیتال کردن مستقیم پالس به ازای هر پارامتر در هر رویدادی تعداد زیادی مقادیر دیجیتال داریم. ولی در روش دیجیتالی کردن با مدار انتگرال گیر و مدار پالس کشیده به ازای هر پارامتر در هر رویدادی یک مقدار دیجیتال نسبت داده می شود. کارایی و عملکرد ADC ها با دو پارامتر توصیف می شوند: سرعت بر حسب MHz و رزولوشن بر حسب بیت. سرعت ADC در روش دیجیتالی مستقیم مهم است زیرا اگر بخواهیم ارتفاع یا مقدار قله یک پالس را با خطایی کمتر از ۰/۱٪ به دست آوریم به نمونه ای نیاز داریم که ارتفاع پالس آن ۱۲۰ برابر باشد. اگر دستگاه سیتومتر پهنای پالسی برابر3 s داشته باشد و ADC آن ٤٠ میلیون تبدیل در هر ثانیه انجام دهد نیاز به دقتی برابر ۱۲۰ اندازه گیری به ازای هر پالس داریم.

مدار همزمان سازی

فلوسایتومترهای امروزی از طریق اتصال دستگاه های متعدد و سخت افزارهای محاسبه منطقی که کل پردازش را انجام می دهند به حالت شبه هوشمند رسیده اند. عملکرد ترکیبات مختلف انتهایی و الکترونیک اندازه گیری با مدار همزمان سازی با یکدیگر هماهنگ می شوند. ماشین های حالت به طور پیوسته بررسی می کنند که آیا مدار تریگر اشباع شده است و سپس مدار انتگرال گیر و peak sample and hold را فعال می کند. حال می توان گفت که پنجره دریافت داده باز است. سیگنال های زمان)clock(تا وقتی که مدار مجزاگر اشباع نشده باشد شمارش می کند، که پهنای سیگنال را می‌سازد. وقتی مدار مجزاگر اشباع می شود مدارهای انتگرال گیر و sample and hold قطع می شوند و پنجره دریافت داده بسته می شود. در مرحله بعد ADCفعال شده و و بار ذخیره شده در مدار sample and hold را خوانده و ولتاژ آن را به مقادیر عددی متناظر

با هر رویداد تبدیل می کند. پس از انجام عمل ADC داده ها به الکترونیک محاسباتی داده می شود و ماشین های حالت،مقدار انتگرال گیرها و مدار sample and hold را صفر می‌کند، بنابر این پالس بعدی بدون دخالت پالس قبلی ثبت می شود.



۳- الکترونیک محاسباتی

الکترونیک محاسباتی، معمولا یک کامپیوتر در نزدیکی سیتومتر، نرم افزار دریافت داده را فعال کرده که عملیات وابسته به تحلیل و نمایش داده ها مثل تنظیمات ذخیره‌سازی و بازسازی داده، جبران سازی رنگی، مرتب سازی، تبدیل خطی به لگاریتمی و ... را انجام می دهد.

جبران سازی فلورانس

۲۰ سال پیش در ۱۹۸۰ جبران سازی رنگ فلورسانس از یک رنگ به کانال فلورسانس مجاور توسط تفریق آنالوگ انجام می گرفت. تفریق آنالوگ دو رنگ نیاز به دو مدار دارد؛ که هر مدار مقدار سیگنال تنظیم شده با کاربر از یک رنگ را از سیگنال های رنگ دیگر کم می‌کند. برای ۳ رنگ به ٦ مدار و برای ٤ رنگ به ۱۲ مدار و برای ٥ رنگ به ۲۰ مدار نیاز است. علاوه بر نیاز به اپراتور برای تنظیم این مدارها، هر مداری نویز الکترونیکی خاص خودش را دارد. بسیاری از فلوسایتومترهای امروزی داده‌های جبران نشده را جمع آوری می کنند؛ اپراتور الکترونیک محاسباتی را برنامه ریزی می‌کند تا عمل جبران‌سازی با استفاده از روش معکوس ماتریس جبر خطی انجام گیرد.

تبدیل لگاریتمی

حدود چندین سال پیش تبدیل داده های خطی به لگاریتمی توسعه یافته است؛ مزیت استفاده از تبدیل لگاریتمی این است که می توان محدوده دینامیک وسیعی از شدت های فلورسانس را نشان داد. این تابع در ابتدا توسط تقویت کننده های لگاریتمی انجام می شد اما درستی این تبدیل نادرست بود زیرا تقویت

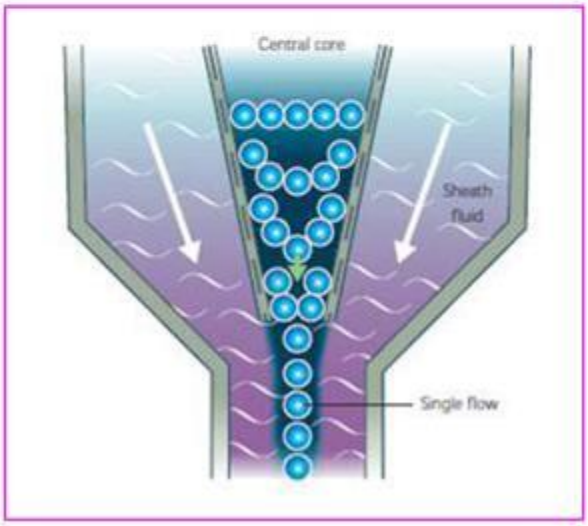
کـنـنـــده هـــای نـــوعـــی لگاریتمی دارای نویز زمینـه و offset هسـتند کـه بـر مشـاهده جمعیـت هـا تـاثیر مـی گذارنـد. ایـن تقویـت کننده ها دارای خطایی در حد ٪۲۰ بوده اند. امـروزه اگـر داده هـای لگـاریتمی مـورد نیـاز باشـند الکترونیـک محاسـباتی یـا کـامپیوتر بـه سـادگی مقـادیر متنـاظر داده هـای خطـی را در جـداول جسـتجو یـا LUT جسـتجو و پیـدا مـی کننـد، بنـابراین اگـر رزولوشـن ADC بـه اندازه کافی باشد خطا کاهش می یابد.

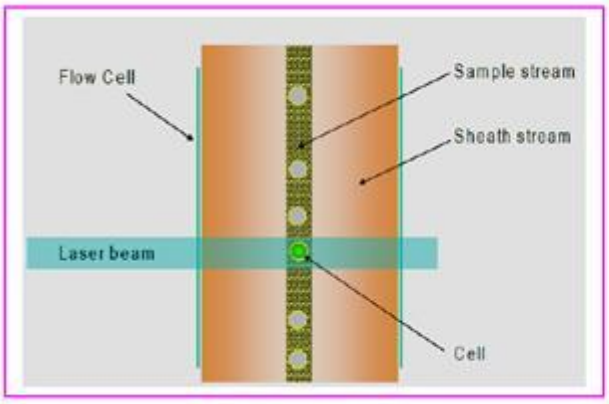
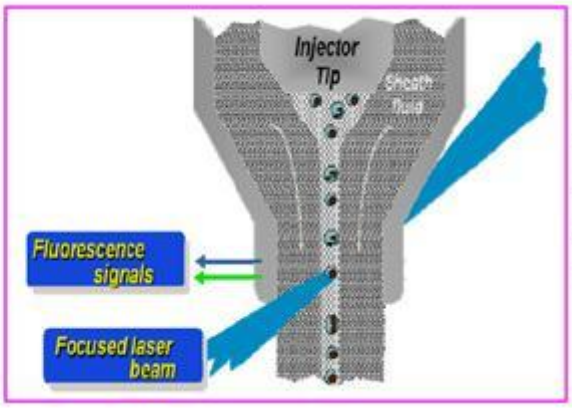
آماده سازی نمونه

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. بعضا یک مرحله تخلیص برای بالا بردن غلظت سلول‌های مورد نظر در نمونه ضرورت پیدا می‌کند. روش‌های مختلفی برای تهیه، تخلیص وآماده 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 نشاندارکردن تحت تاثیر فاکتورهای زیادی مانند میزان اختصاصی بودن آنتی‌بادی و غلظت آنتی‌ژن در سطح یا داخل سلول، مناسب بودن غلظت آنتی بادی مورد استفاده و بکار بردن کنترل‌های مثبت و منفی مناسب در آنالیز سلول‌ها قرار می‌گیرد.

تمرکز هیدرودینامیک Hydrodinamic Focousing

خصوصیت اصلی یک سیستم فلوسایتومتری این است که اندازه گیری ها بر روی نمونه های سلولی که در دستگاه جریان می یابند، انجام می شود. 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 تکرار پذیر سلول ها استفاده شود، احتمال دارد با عبور سلول های بزرگتر مسیر بسته شود. برای حل این مشکل از روش " تمرکز هیدرودینامیک Hydrodinamic Focousing " کمک گرفته می شود. در این روش جریان آرامی از سلول ها را به درون جریان حامل سریع (Sheath fluid) وارد می کنند. مایع حامل، سلول ها را در مرکز لوله متمرکز می کند، بنابراین سلول ها به طور منظم و در یک مسیر مجازی به نقطه اندازه گیری منتقل می شوند.



هدف از آماده‌سازی 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 هیدرو دینامیکی 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 شیشه ای با سرعتی حدود ۵ تا ۵۰ متر در ثانیه از میان منفذی باریک و از مقابل پرتوی یک یا چند منبع نوری که غالبا لیزر است، عبور می‌کنند. بدین ترتیب امکان جمع‌آوری اطلاعات مربوط به ۵۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰ سلول در هر ثانیه فراهم می‌شود.