

Микротомография и микроручевая терапия биологических объектов с использованием синхротронного излучения

Евгений Козырев^{a,b}, Константин Купер^a, Александр Попов^a,
Алексей Петрожицкий^a

^a*Budker Institute of Nuclear Physics, SB RAS, Novosibirsk, 630090, Russia*

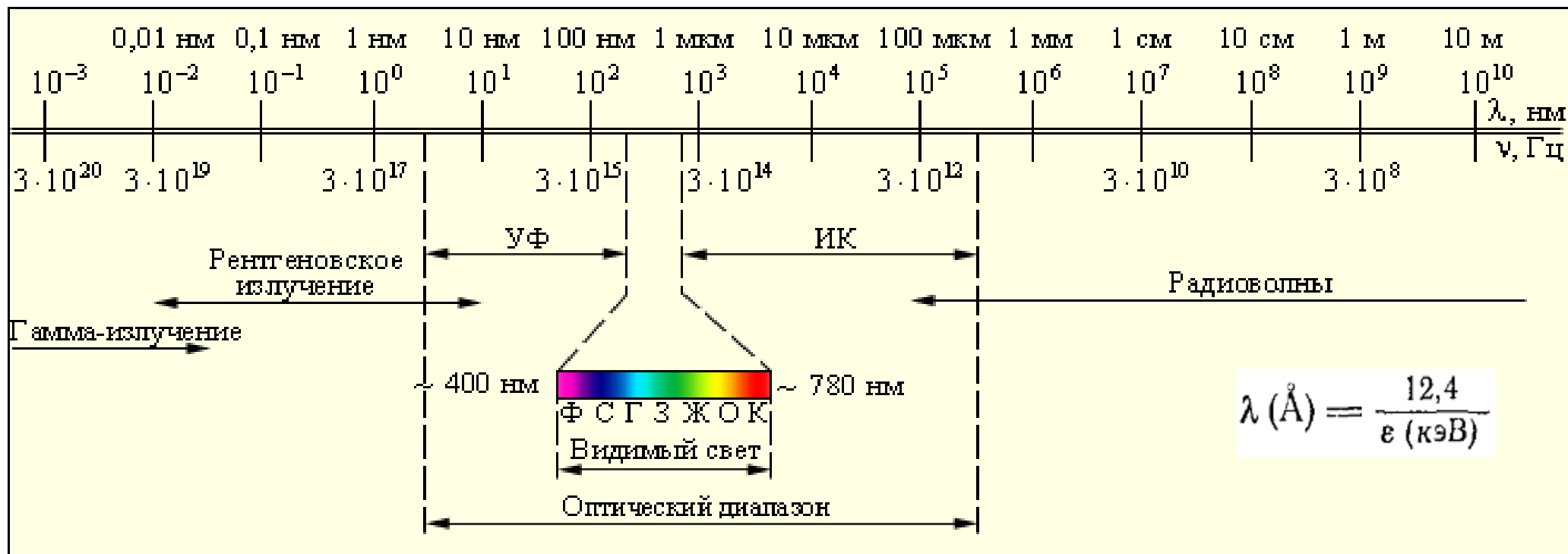
^b*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090, Russia*

e.a.kozyrev@inp.nsk.su, +7 923 138 9395



50-я Зимняя школа ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии
29 февраля — 5 марта 2016 г.

ВВЕДЕНИЕ



Рентгеновский диапазон электро-магнитных волн характеризуется большой проникающей способностью. Удобен как для томографии, так и для лучевой терапии.

Ключевая идея:

Конвертация рентгена, обладающего высокой проникающей способностью + малой длиной волны (12 кэВ \sim 1 \AA), в видимый свет, регистрация которого менее затруднительна

Источники СИ в ИЯФ СО РАН

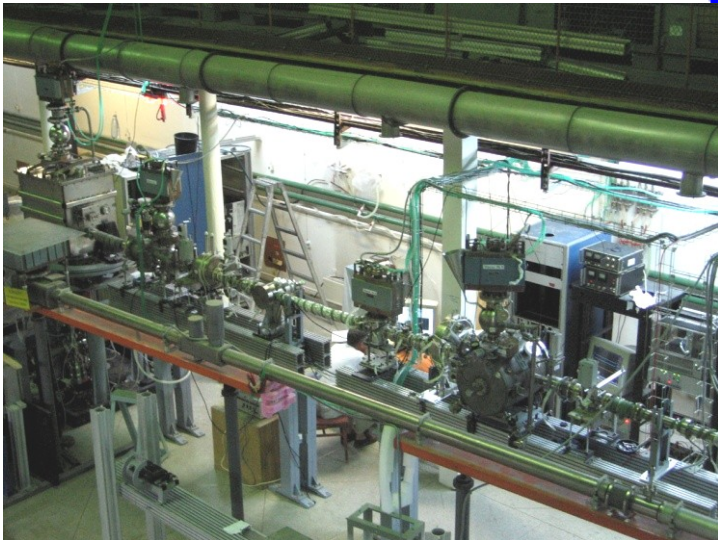
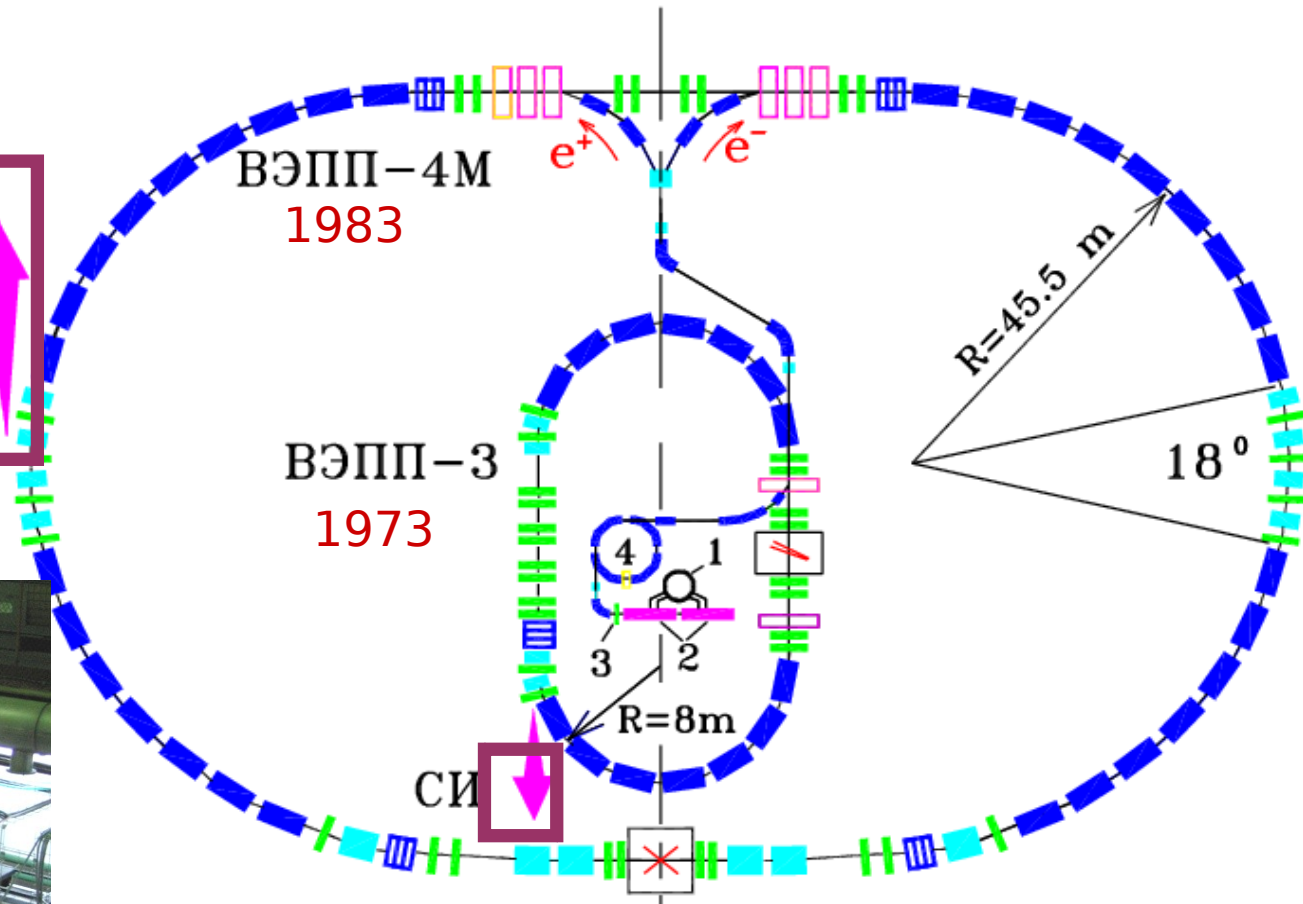
Инжектор:

1 — Гиротрон (430 МГц)

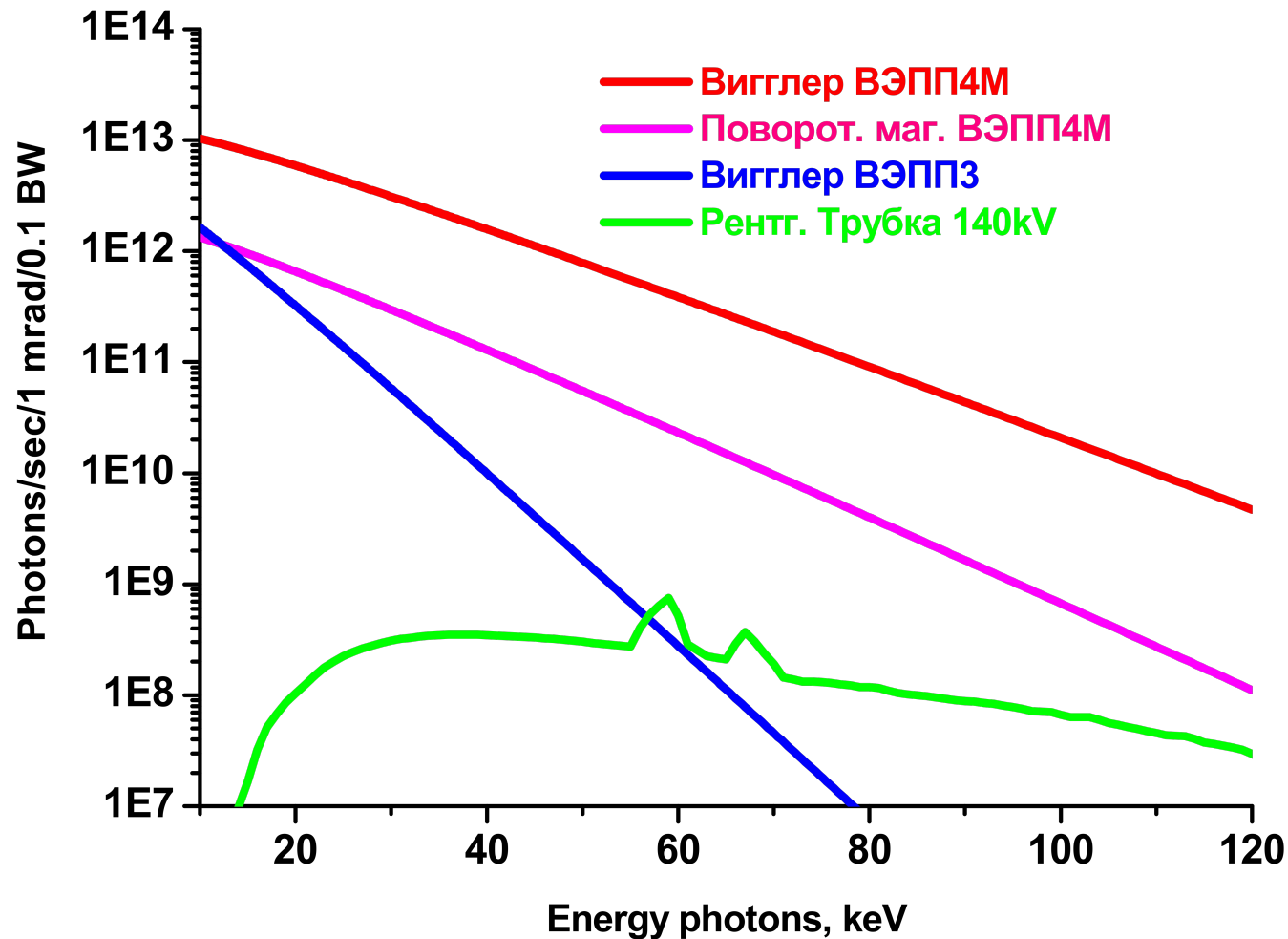
2 — Линейный
ускоритель (50 МэВ)

3 — Электрон-
позитронный
конвертор

4 — Синхротрон Б-4
(350 МэВ)

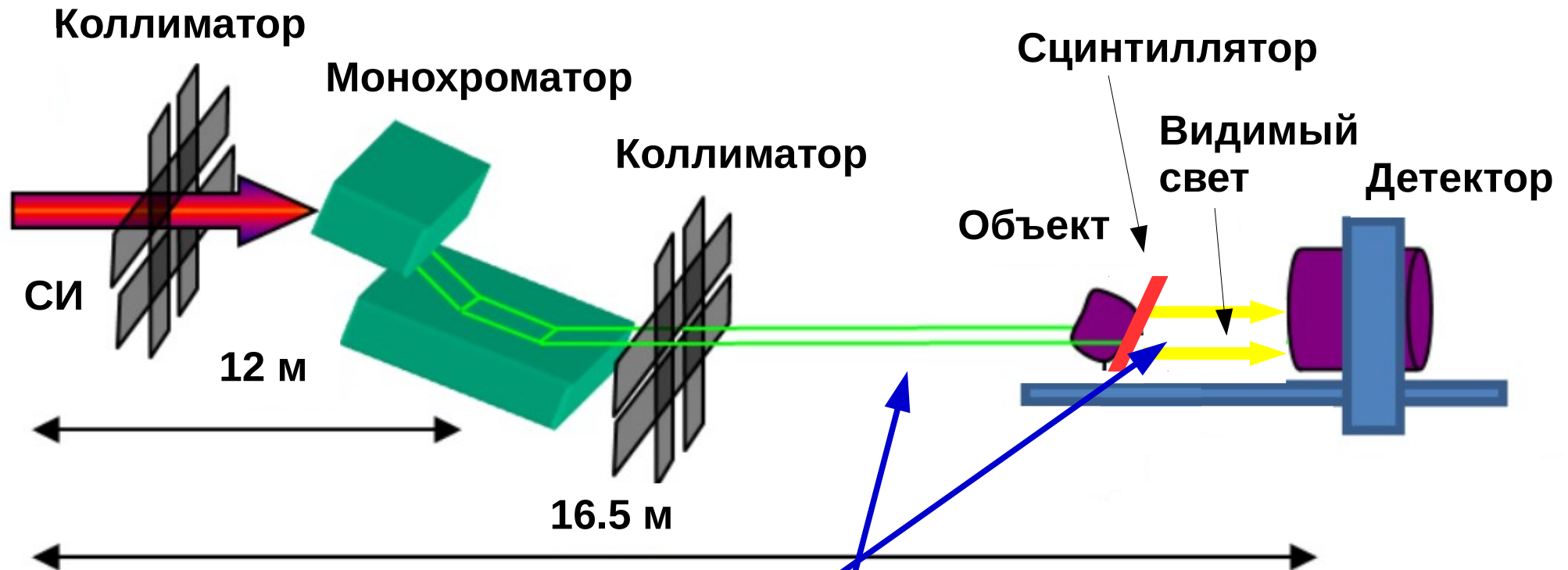


Источники СИ в ИЯФ СО РАН



Широкий энергетический спектр **[5-100] кэВ** позволяет диагностировать объекты разной толщины, начиная от **~ 10 мкм биологической ткани** и заканчивая **~ 5 см горной породы**.

Рентгеновское синхротронное излучение позволяет неразрушающим образом определять внутреннюю структуру объектов



μ зависит от длины волны СИ
и от элементного состава
объекта

ρ — плотность объекта по
пути СИ

$$I = I_0 \exp\left(-\int_L \mu(\lambda, s) \rho(s) ds\right)$$

**Измерив I можно
восстановить $\rho(x, y, z)$**

Рентгеновское синхротронное излучение позволяет неразрушающим образом определять внутреннюю структуру объектов

Коллиматор

Монохроматор

Сцинтиллятор

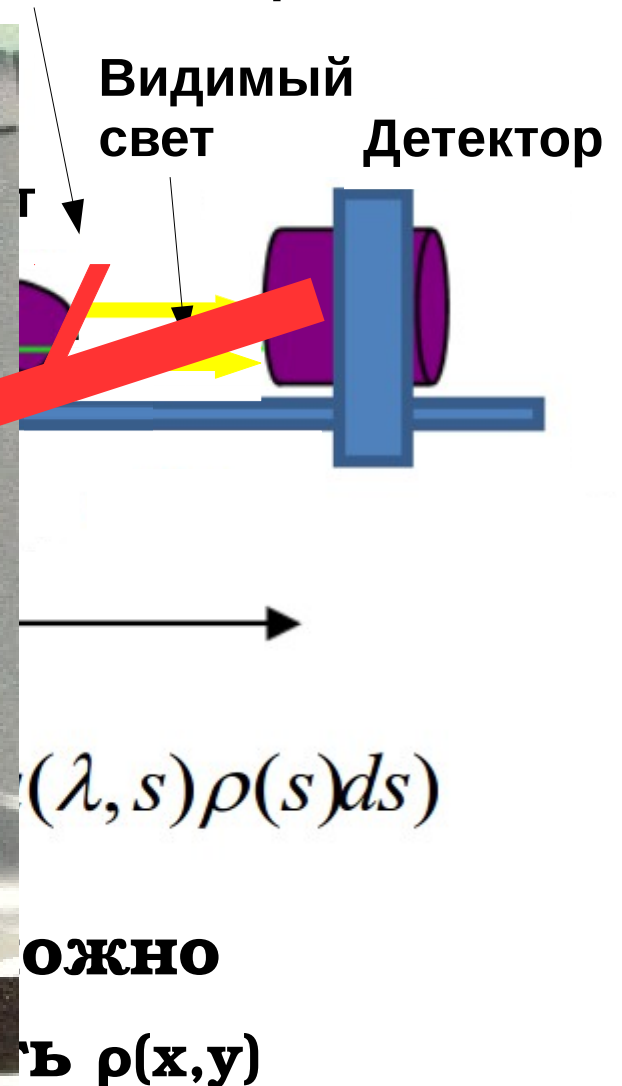
Видимый
свет

Детектор

$$(\lambda, s) \rho(s) ds$$

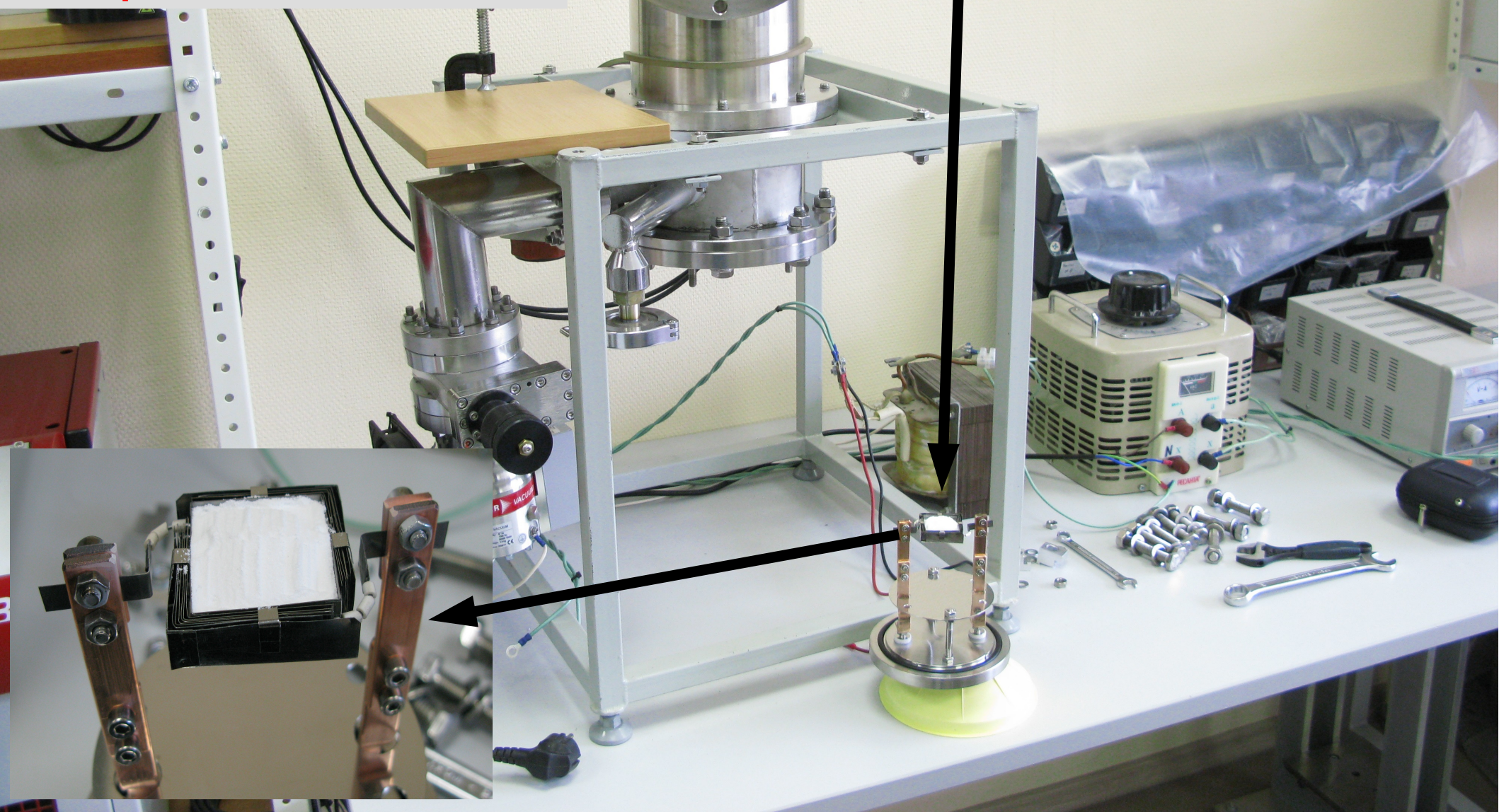
ОЖНО

ть $\rho(x, y)$



Сцинтиляционные
пластины создаются
методом вакуумного
напыления на
стеклянную подложку
толщиной 100 мкм

Порошкообразный
сцинтиллятор
 CsI(Tl) напыляется
тонким слоем (3-5 мкм)

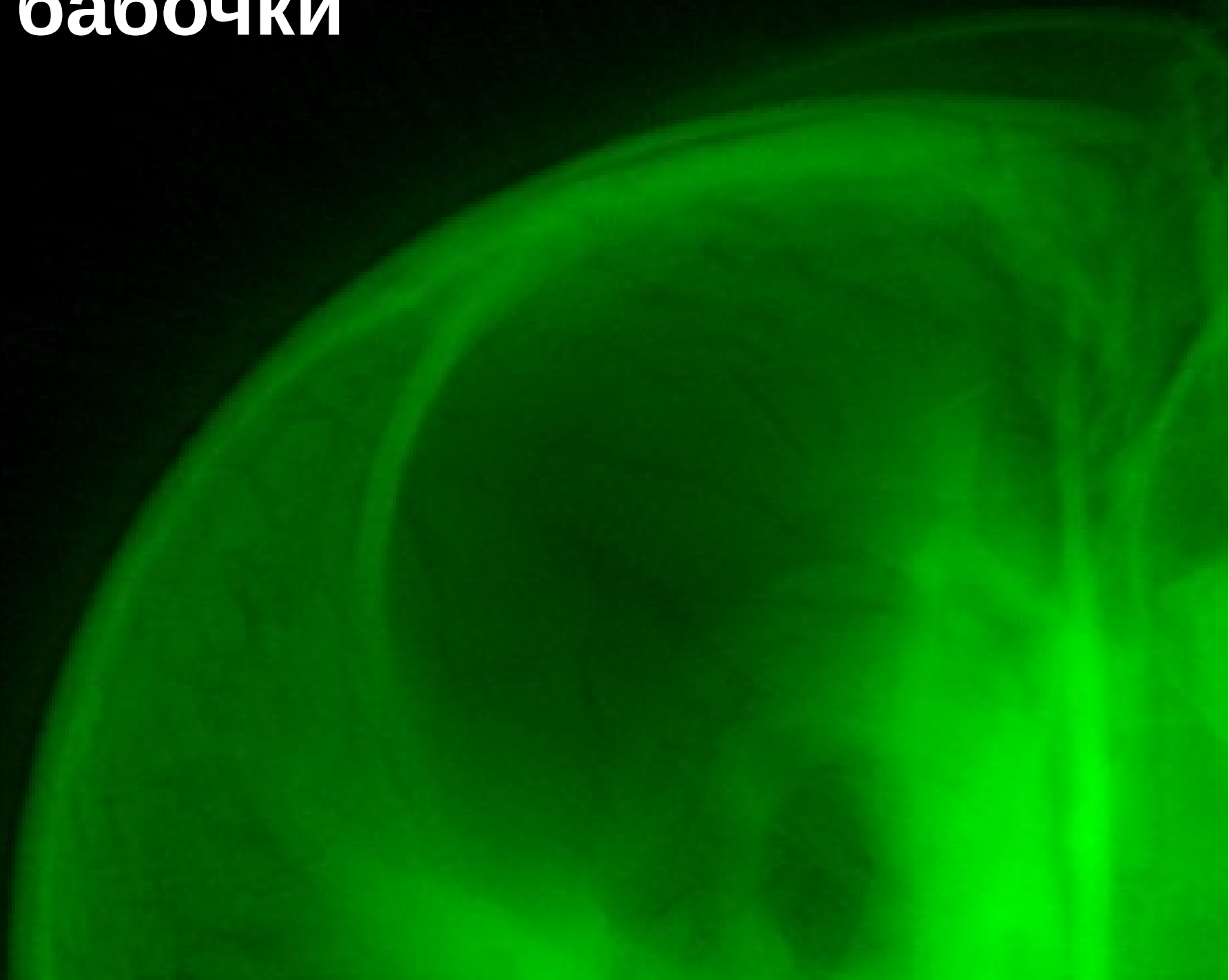


Поверхность сцинтиляционной пленки

30.0kV x20.0k SE 12/22/2015

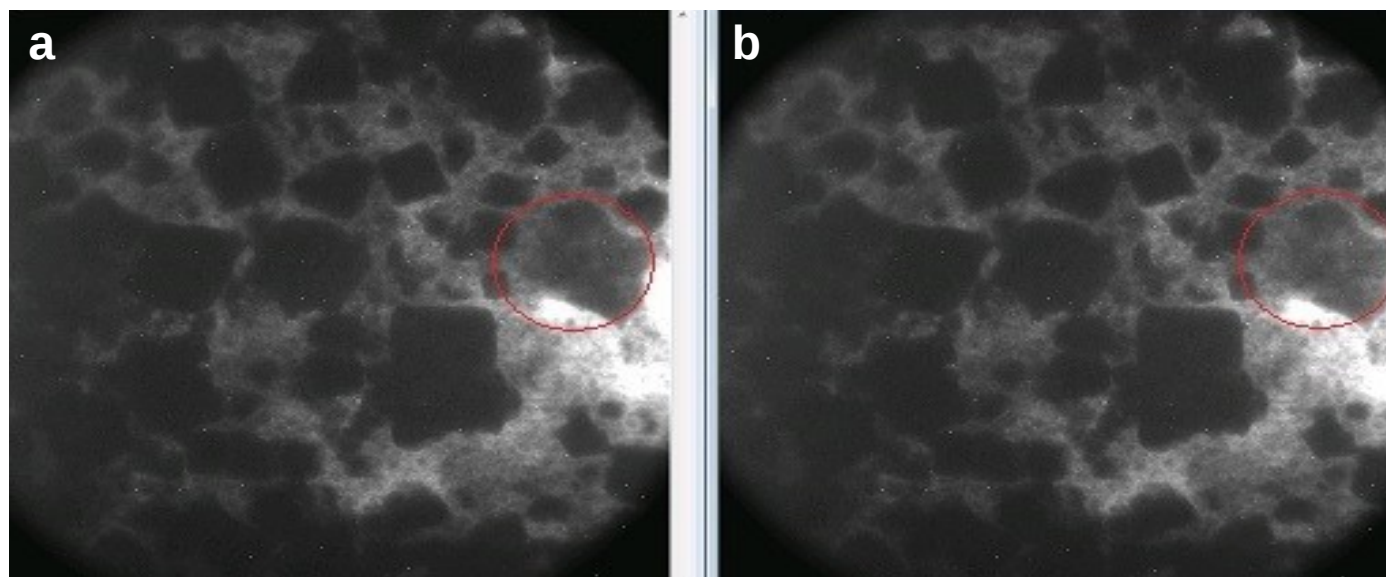
2.00um

Глаз бабочки

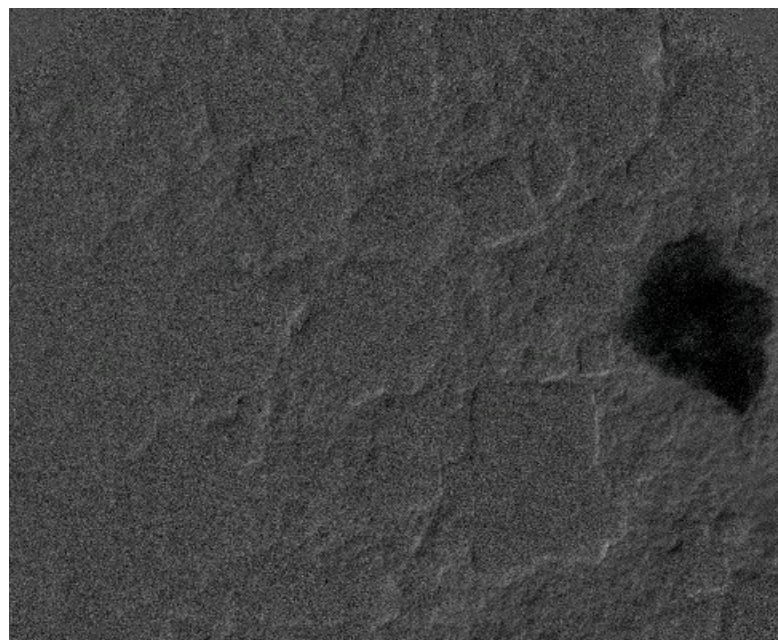


Куриное ребро

1.5 мм



Изображение поликомпозиционного высокоэнергетического топлива при энергиях $E = 6.537 \text{ keV}$ (a) и $E = 6 \text{ keV}$ (b)



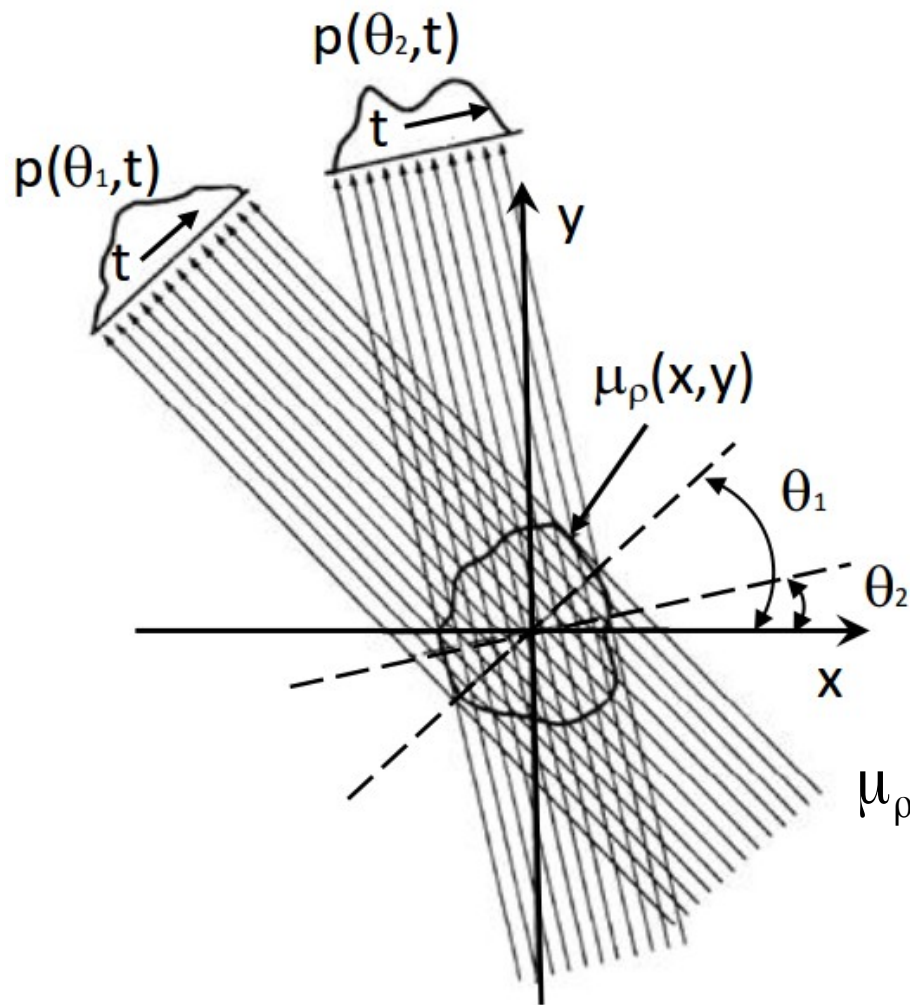
Энергия электронной К-оболочки
 $W_{\text{K}}^{\text{Mn}} = 6.29 \text{ кэВ}$.

Контрастный участок соответствует компоненте из Mn.

Разница Fig. a - Fig. b

Компьютерная томография

Набор проекционных данных, получаемых при вращении образца



$$p(t, \theta_1) = \int_L \mu_\rho(t, s) ds$$

$$p(t, \theta_2) = \int_L \mu_\rho(t, s) ds$$

.....

$$p(t, \theta_n) = \int_L \mu_\rho(t, s) ds$$

Набор проекционных данных, где $\mu_\rho = \mu \cdot \rho$ - удельный коэффициент поглощения рентгеновского излучения.

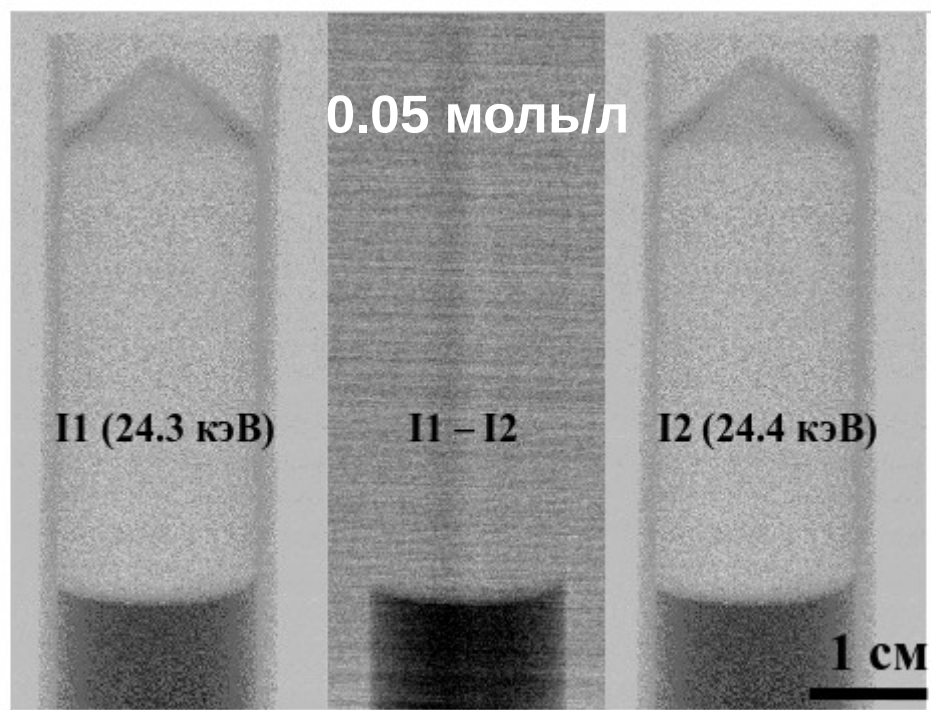


Теорема о центральном сечении

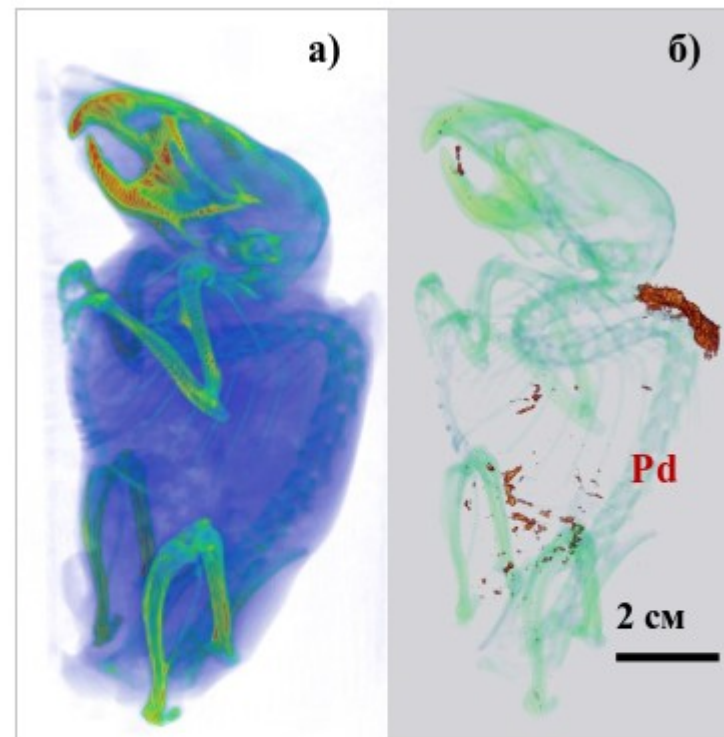
Фурье-образ $P(\omega, \theta) = F(\omega \cdot \cos \theta, \omega \cdot \sin \theta)$, где F — Фурье-образ μ



$$\mu_\rho(x, y) = \frac{1}{4\pi^2} \iint \omega P(\omega, \theta) e^{i\omega(x \cos \theta + y \sin \theta)} d\omega d\theta$$



Разностная радиография палладий содержащего препарата

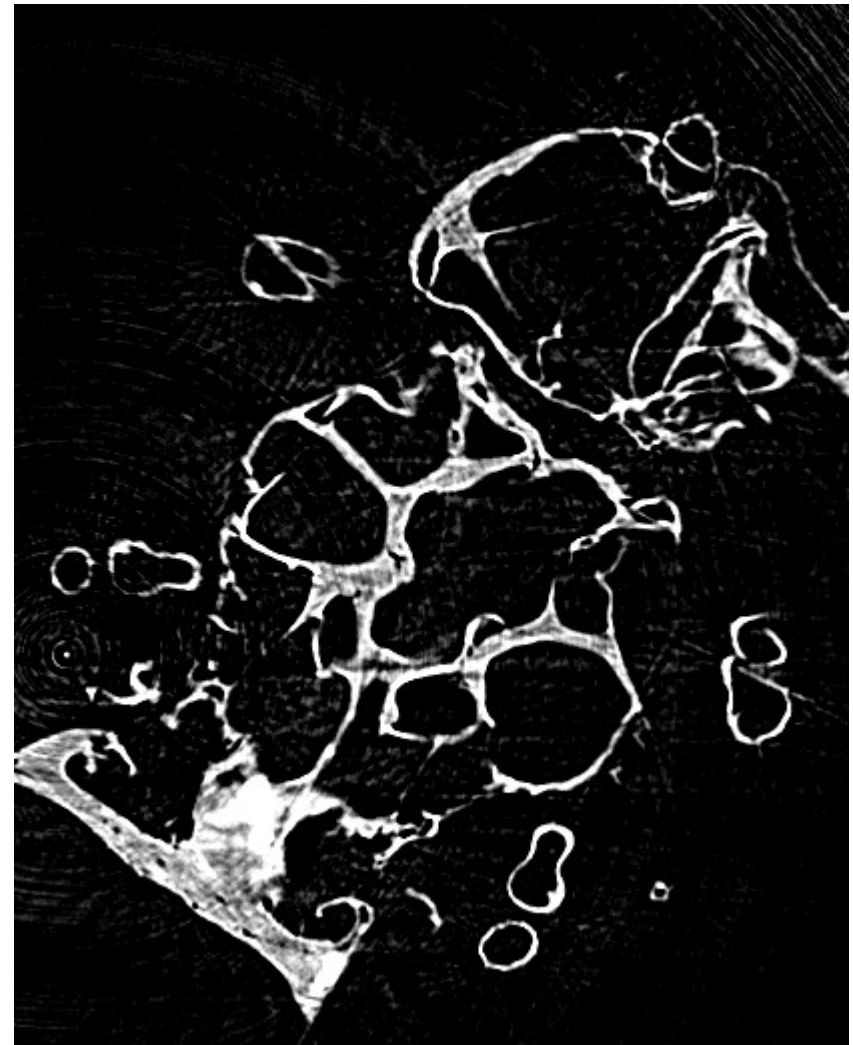


(а) - томография лабораторной мыши,

(б) – трехмерное распределение

палладий-содержащего препарата в теле мыши

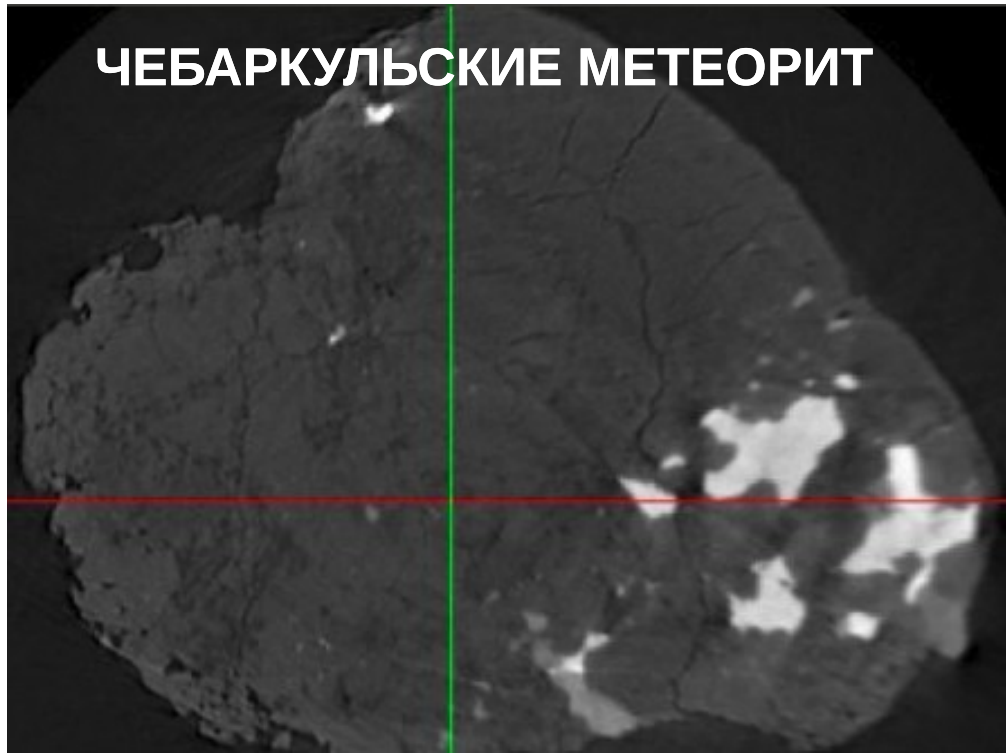
Далее надеемся получить схожее распределение висмут трикалия дицитрата (ВТД), что позволит нам лучше понять его транспортировку в теле лабораторных животных.



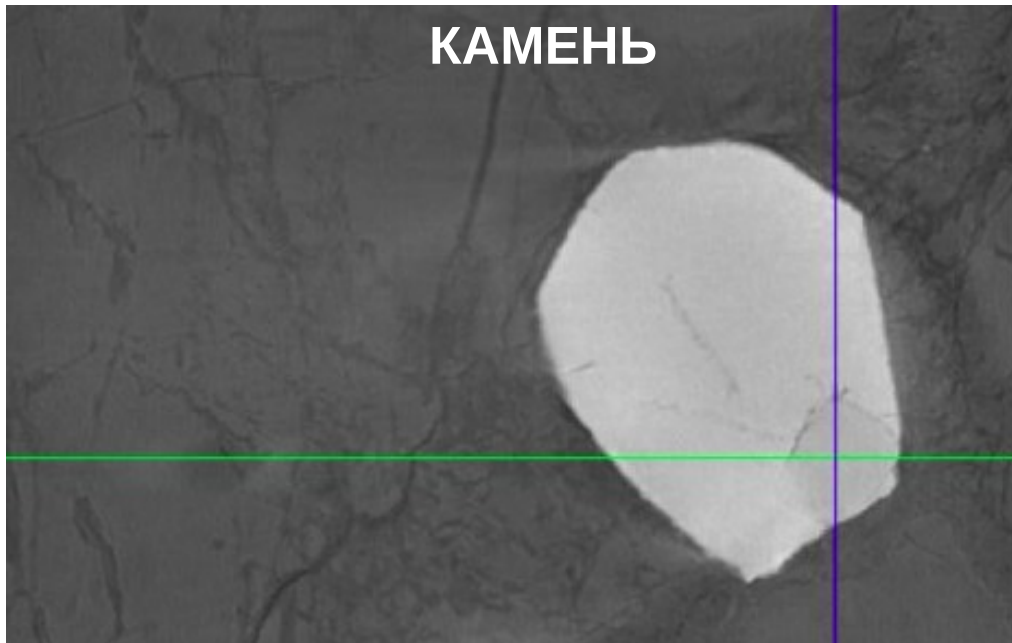
Микротомография биологических объектов позволяет определить внутреннюю структуру + распределение плотности с **пространственным разрешением ~ 1 мкм.**

Можно восстановить распределение плотности внутри кости, отслеживая наличие остеоцитов, дефектов или других особенностей, приводящих, например, к остеопорозу.

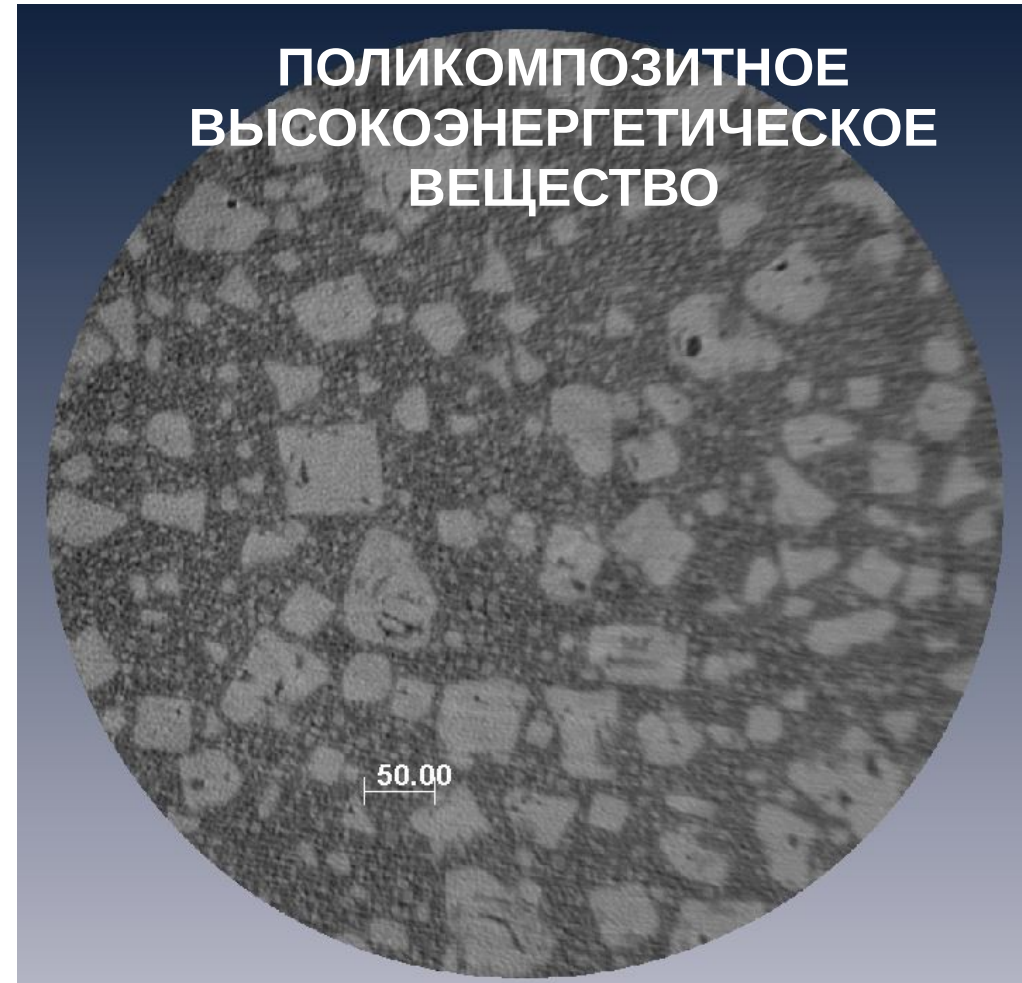
ЧЕБАРКУЛЬСКИЕ МЕТЕОРИТ



КАМЕНЬ



ПОЛИКОМПОЗИТНОЕ
ВЫСОКОЭНЕРГЕТИЧЕСКОЕ
ВЕЩЕСТВО



Вывод 1. Синхротронное рентгеновское излучение + тонкие пленки сцинтиллятора позволяют производить томографию объектов с пространственным разрешением < 1 мкм.

Если Вам нужно неразрушающим образом
заглянуть внутрь объекта,
WELCOME TO VINP!

Метод микропучковой радиационной терапии

Это один из подходов к достижению МАКСИМАЛЬНОГО поражения опухолевых клеток при МИНИМАЛЬНОМ поражении здоровых тканей.

Метод микропучковой радиационной терапии

Это один из подходов к достижению **МАКСИМАЛЬНОГО** поражения опухолевых клеток при **МИНИМАЛЬНОМ** поражении здоровых тканей.

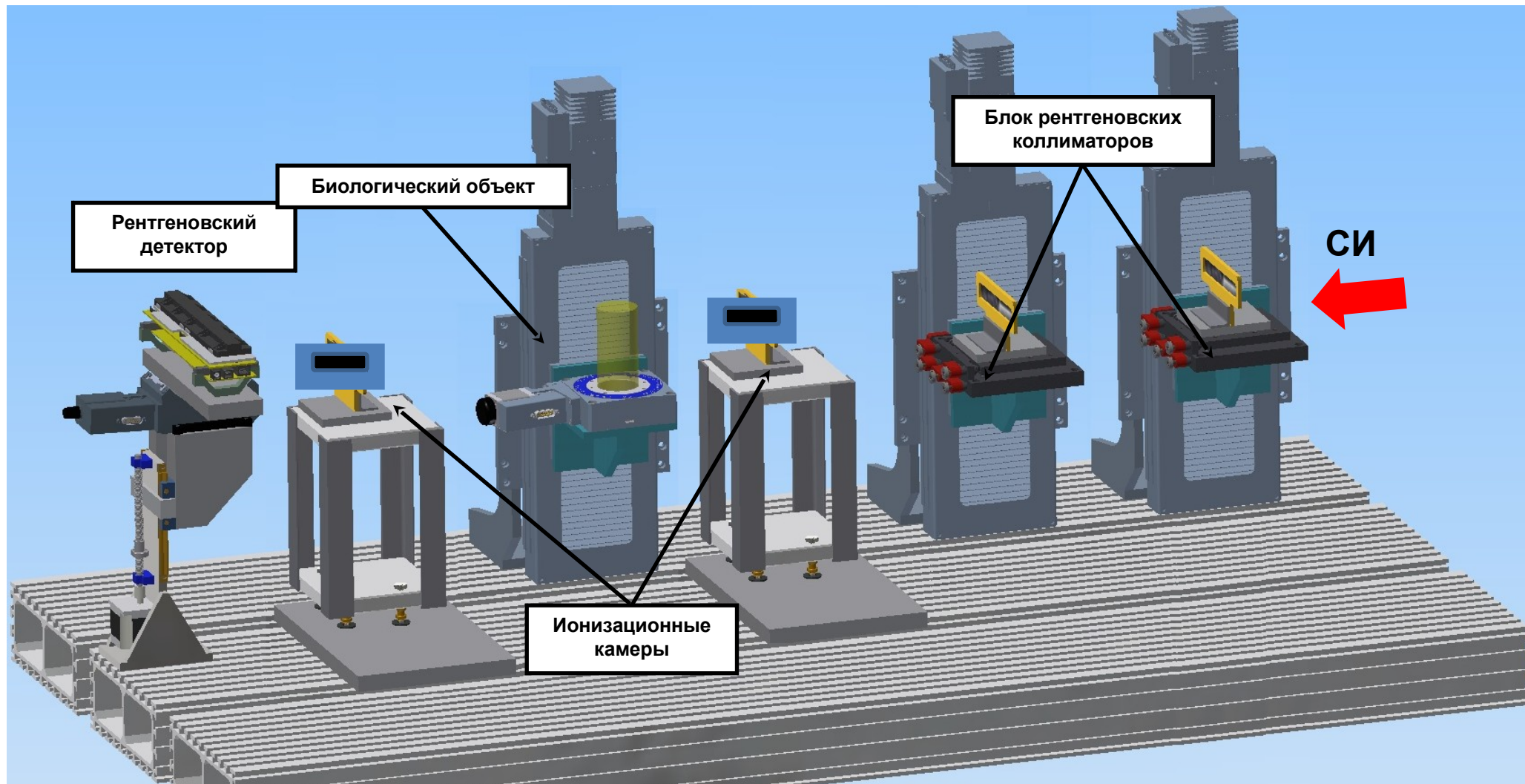
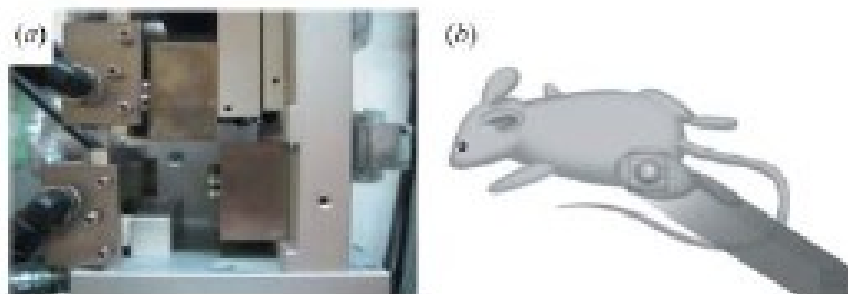


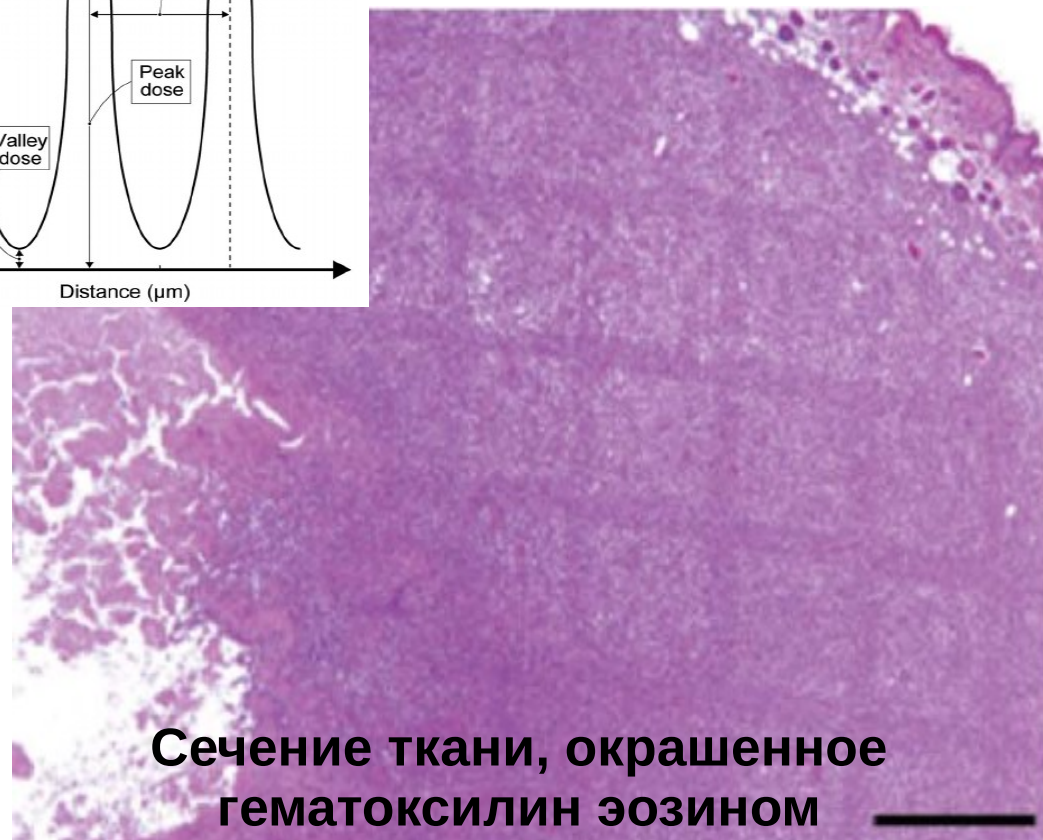
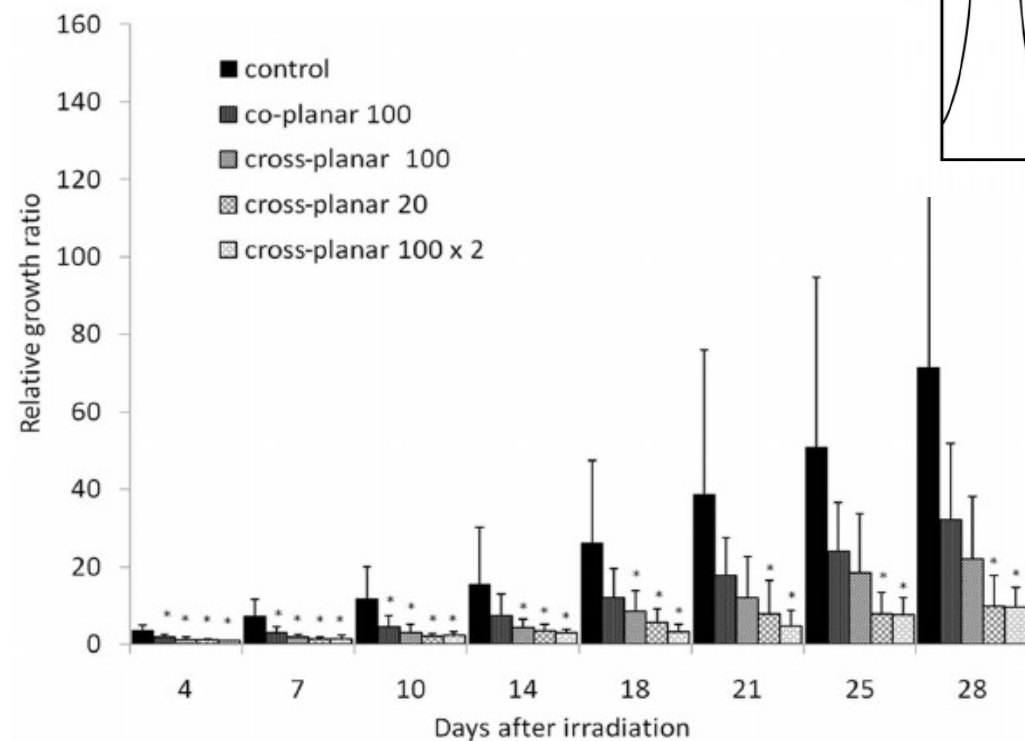
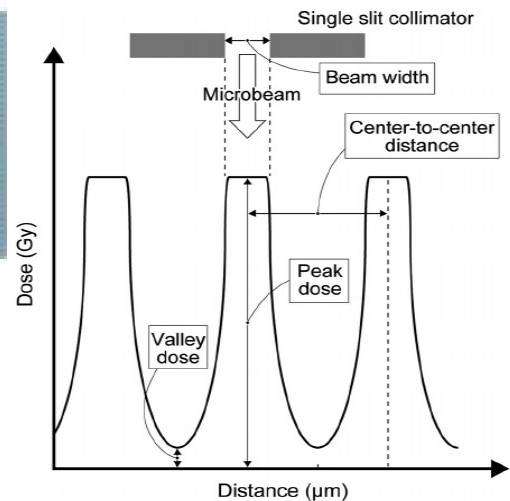
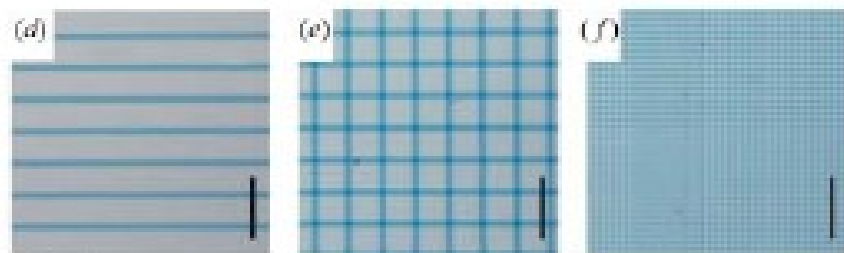
Схема для проведения МпРТ

Пример экспериментальной МпРТ клеток человеческой глиомы U251.



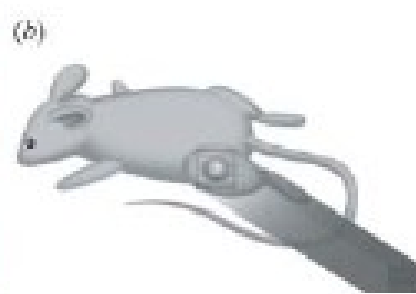
A narrow microbeam is more effective for tumor growth suppression than a wide microbeam: an *in vivo* study using implanted human glioma cells

Atsushi Uyama,^{a*} Takeshi Kondoh,^a Nobuteru Nariyama,^b Keiji Umetani,^b Manabu Fukumoto,^c Kunio Shinohara^d and Eiji Kohmura^a



Сечение ткани, окрашенное гематоксилин эозином

Пример экспериментальной МпРТ клеток человеческой глиомы U251.



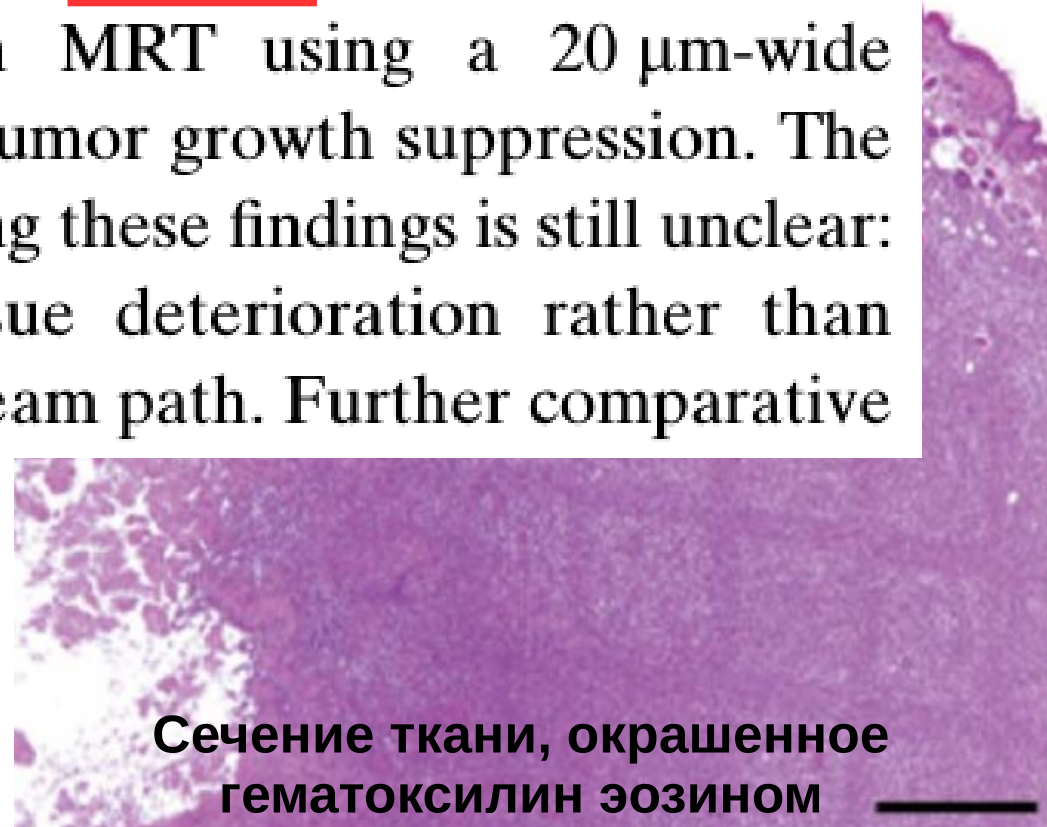
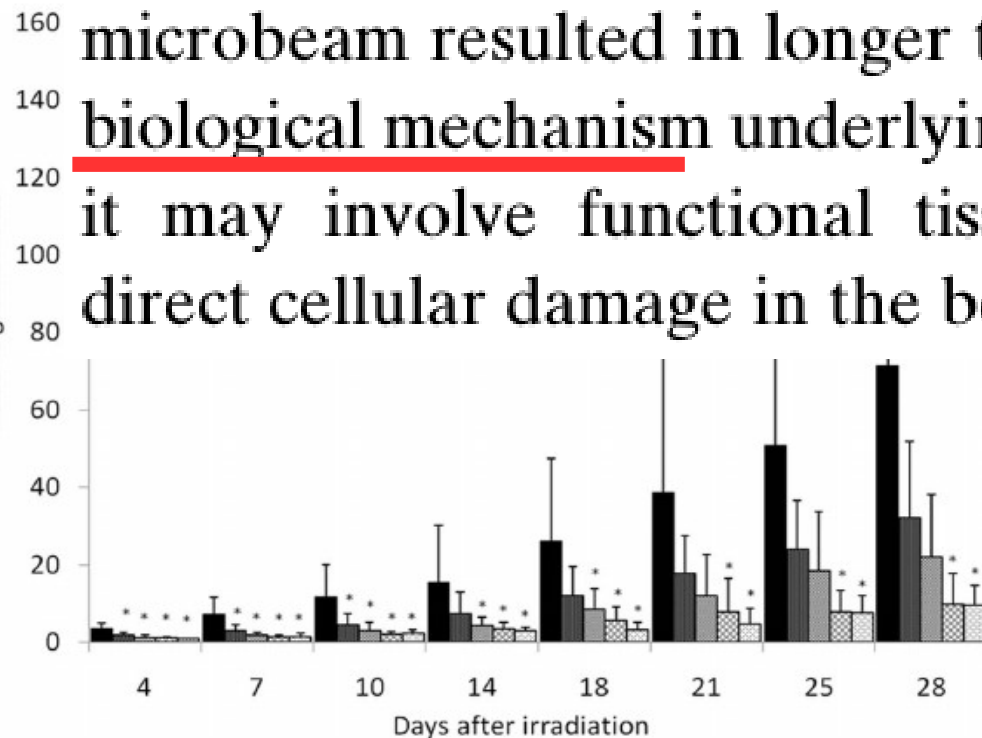
A narrow microbeam is more effective for tumor growth suppression than a wide microbeam: an *in vivo* study using implanted human glioma cells

Atsushi Uyama,^{a*} Takeshi Kondoh,^a Nobuteru Nariyama,^b Keiji Umetani,^b Manabu Fukumoto,^c Kunio Shinohara^d and Eiji Kohmura^a

Single slit collimator



In conclusion, MRT using a 100 μm -wide microbeam with 500 μm center-to-center distance resulted in moderate tumor growth suppression, although MRT using a 20 μm -wide microbeam resulted in longer tumor growth suppression. The biological mechanism underlying these findings is still unclear: it may involve functional tissue deterioration rather than direct cellular damage in the beam path. Further comparative



Сечение ткани, окрашенное гематоксилин эозином

Задачи:

1. Механизмы дифференциального влияния МпРТ на опухоли и здоровые ткани:

- А). Гипотеза различной скорости восстановления сосудов;
- Б). Регенерация за счет окружающих очаг воздействия здоровых тканей;
- В). Метаболиты гибнущих клеток.

2. Оптимизация терапевтического эффекта:

- А). Геометрия микропучков, интенсивность и продолжительность воздействия;
- Б). Комбинирование МпРТ и химиотерапии;
- В). Комбинирование МпРТ и наночастиц.



**Для решения данных проблем в ИЯФе + ИЦИГе СО РАН
стартовал эксперимент с линией клеток глиомы U87**

Этап 1. Метод микропучковой радиационной терапии.

Глиобластомы – нейроэктодермальные опухоли головного мозга, заболеваемость которыми с каждым годом продолжает расти.

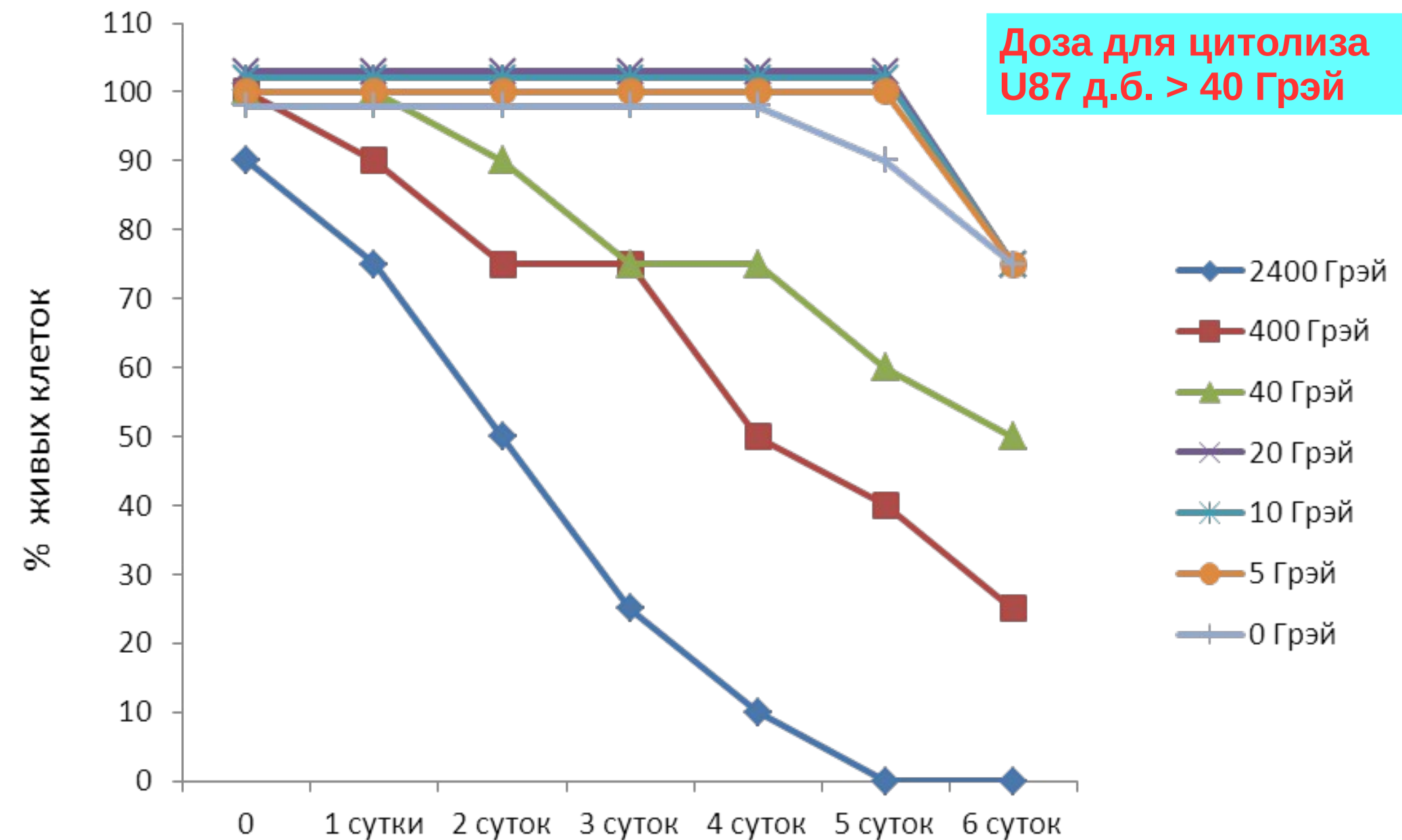
Данный тип новообразования крайне «агрессивен», что значительно усложняет процесс терапии, и средняя продолжительность жизни больных глиобластомой не превышает 9–12 месяцев.

За 2-3 недели до начала эксперимента культуры клеток глиомы U-87 размораживали и культивировали на среде DMEM\F12 (1:1) с 10% фетальной сыворотки.

Жизнеспособность культур клеток определяли визуальным наблюдением в световой микроскоп, а также с помощью витальных красителей.

В качестве дополнения к визуальному наблюдению жизнеспособности культур клеток в световой микроскоп использовали окрашивание витальным красителем, нейтральным красным или 2-метил- 3- амино- 6- диметиламинофеназин - $C_{15}H_{17}N_4Cl$ 28.

Этап 1. Метод микропучковой радиационной терапии.



Определение минимальной дозы облучения, вызывающей цитолиз культуры клеток глиобластомы U-87.

Этап 2. Метод микропучковой радиационной терапии.

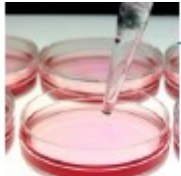
Цель - оценка динамики развития культуры клеток глиобластомы человека U87 после микропучкового синхротронного облучения в сочетании с насыщением опухолевых клеток наночастицами марганца. Такая комбинация может дать синергический эффект, основанный на образовании активных радикалов, чей окислительный эффект будет усилен наночастицами марганца.

Доза, Гр (грей)	Нано частицы (мкг/мл)	ЦПД* наночастиц на клетки до облучения – период действия 18 часов	Цитопатическое действие (ЦПД) облучения на клетки (доля неживых или лизированных клеток)					
			Период наблюдения					
			1 час	18 часов	36 часов	54 часа	120 часов	148 часов
400	Оксид марганца <u>MnO</u> 500 мкг/мл	25	100	100	100			
40		25	100	100	100			
20		25	100	100	100			
0		25	25	50	100			
400	Оксид марганца <u>MnO</u> 50 мкг/мл	Н	Н	100	100			
40		Н	Н	100	100			
20		Н	Н	100	100			
0		Н	Н	25	75	100		
400	Окись кремния <u>Si₂O</u> 500 мкг/мл	Н	Н	Н	Н	Н	Н	±
40		Н	Н	Н	Н	Н	Н	±
20		Н	Н	Н	Н	Н	Н	±
0		Н	Н	Н	Н	Н	Н	±
400	0 мкг/мл	Н	Н	Н	Н	25	100	
40		Н	Н	Н	Н	10	40	50
20		Н	Н	Н	Н	Н	Н	50
К-			Н	Н	Н	Н	Н	±

1. СИ усиливает токсический эффект MnO
2. Присутствие Si₂O ни на что не влияет

Этап 3. Метод микропучковой радиационной терапии.

Цель - оценка динамики изменения здоровых тканей животного и глиобластомы человека U87 после микропучкового синхротронного облучения.



Инокуляция
клеток
глиомы U87
мышам
NOD/SCID

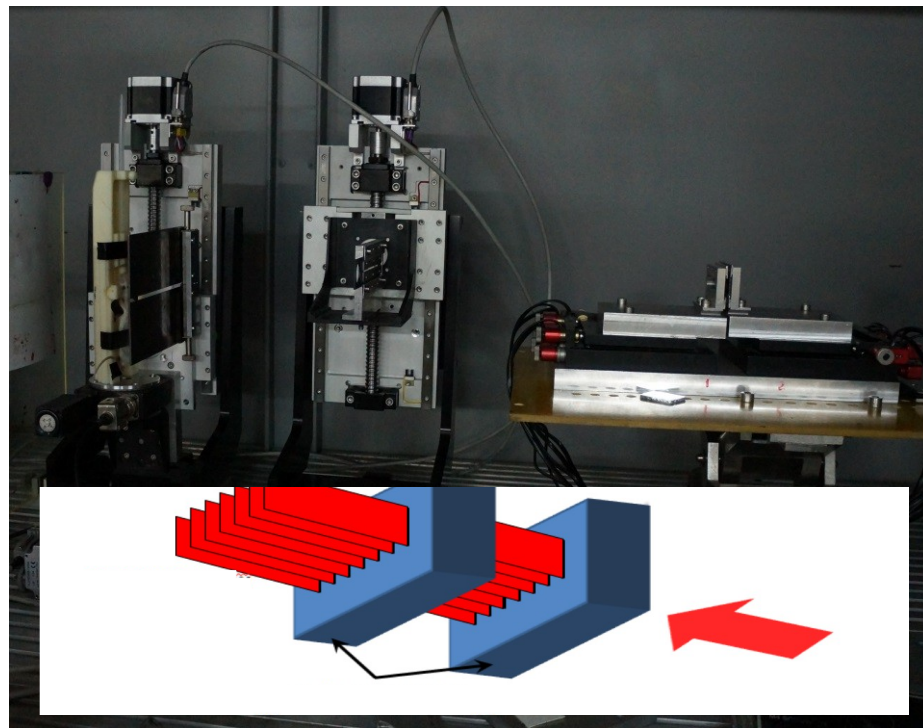
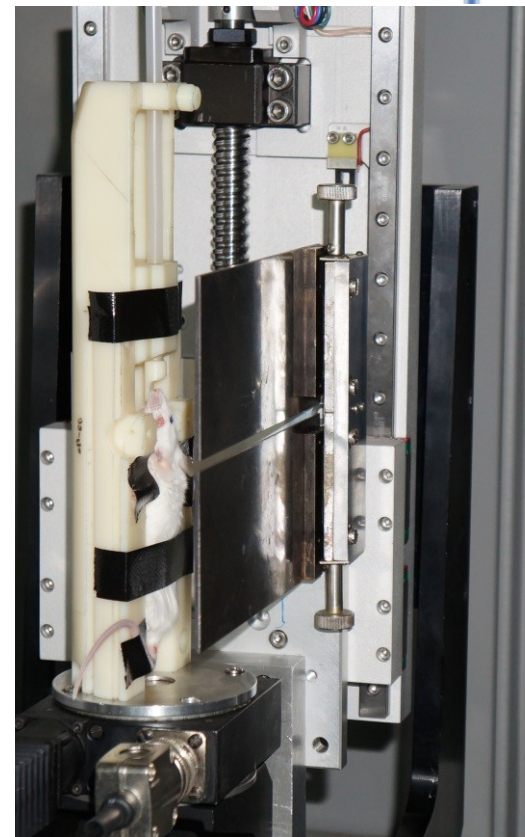


500 тыс. клеток на животное

20 мышей (+ 20 контрольных)

Поглощенная доза составляла от 400 до 1600 Гр.

Через сутки после облучения всех животных сканировали на томографе BioSpec 117/16 USR для оценки эффективности микропучкового излучения в подавлении роста глиобластомы.



Этап 3. Метод микропучковой радиационной терапии.



Состояние эпителиальной выстилки носовой полости мыши.
А – контроль. Б – через 1 сутки после микропучкового облучения.

Вывод 1. Синхротронное рентгеновское излучение + тонкие пленки сцинтиллятора позволяют производить томографию объектов с пространственным разрешением < 1 мкм.

Если Вам нужно неразрушающим образом заглянуть
внутрь объекта,
WELCOME TO BINP!

Вывод 2. В СО РАН начато развитие методики микропучковой томографии. Первые эксперименты показали, что выбранные условия облучения животных не приводили к видимым изменениям ткани опухоли, но сопровождалась трансформацией клеточного эпителия носовой полости мыши.