



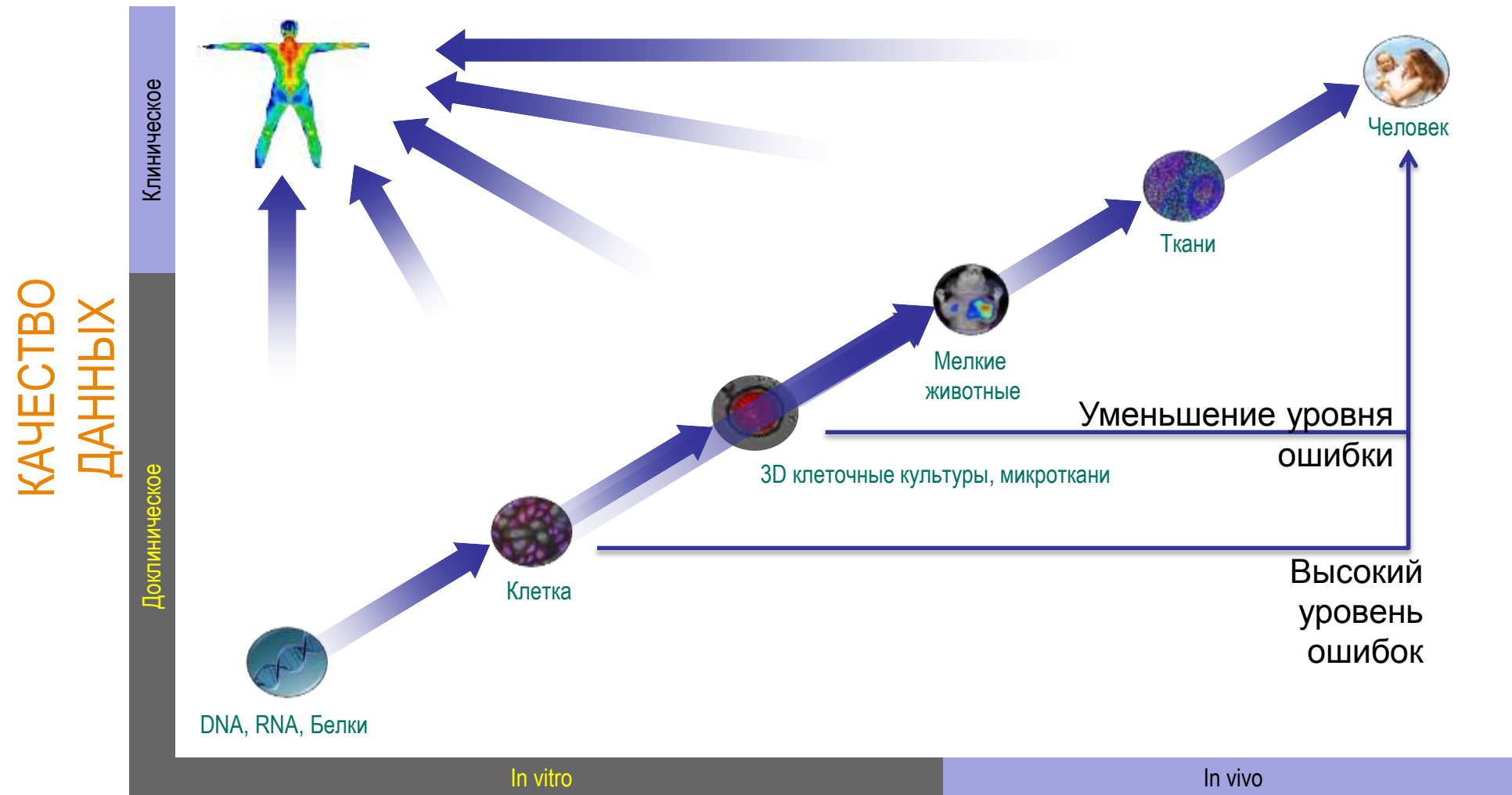
Имиджинг In Vivo

Открытия со скоростью света



Чалов Сергей Евгеньевич (кхн)
“ЗАО Приборы”





СТОИМОСТЬ ТЕСТИРОВАНИЯ

Хорошее понимание *in vitro* – уменьшению рисков нового соединения

Локализовать, Определить и Рассчитать значения на системах ПК

ДНК

РНК

Белок

Клетка

Организм

The image contains various scientific illustrations and photographs of laboratory equipment. On the left, there are diagrams of DNA and RNA, a schematic of a protein with a fluorophore and a quencher, and a schematic of a cell with a nucleus. In the center, there are images of a microscope, a computer monitor displaying a cell image, a keyboard, and a printer. On the right, there are images of test tubes, a large piece of laboratory equipment, and a computer workstation with a monitor and keyboard. At the bottom, there are images of a large piece of laboratory equipment and a diagram of a cell with a nucleus.



МИКРОСКОПИЯ

UltraVIEW® VoX 3D
Система для работы
на клеточном уровне
в реальном времени



Velocity®
Программное
обеспечение для
работы с 3D
изображениями



Columbus™ Серверное
программное обеспечение
для работы с данными и
проведением анализа

Vectra™
Система для
анализа тканей



Inform™



- Программное обеспечение
- Морфологический анализ тканей
 - Количественная оценка
- Анализ тканей на клеточном уровне
 - "Тканевая цитометрия"

СКРИНИНГ



Opera® Полностью
авторизованная
система
высокоскоростного
скрининга клеточных

Operetta® система
высокоскоростного
скрининга
клеточных
культур



cell::explorer™
Автоматизированная
платформа

Микропланшеты



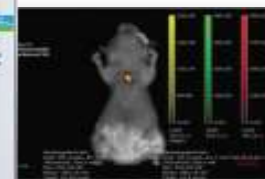
Velocity 3D Image
Программное
обеспечение

**Columbus – Программное
обеспечение сервера для
сохранения и проведения
анализа данных**



Флуоресцентные
красители, *in vitro*

ДОКЛИНИКА



FMT® Система для
визуализации *in vivo*

Ivis-Spectrum CT Система
оптической визуализации
нескольких объектов с
возможностью
проведения
компьютерной
томографии *in-vivo*



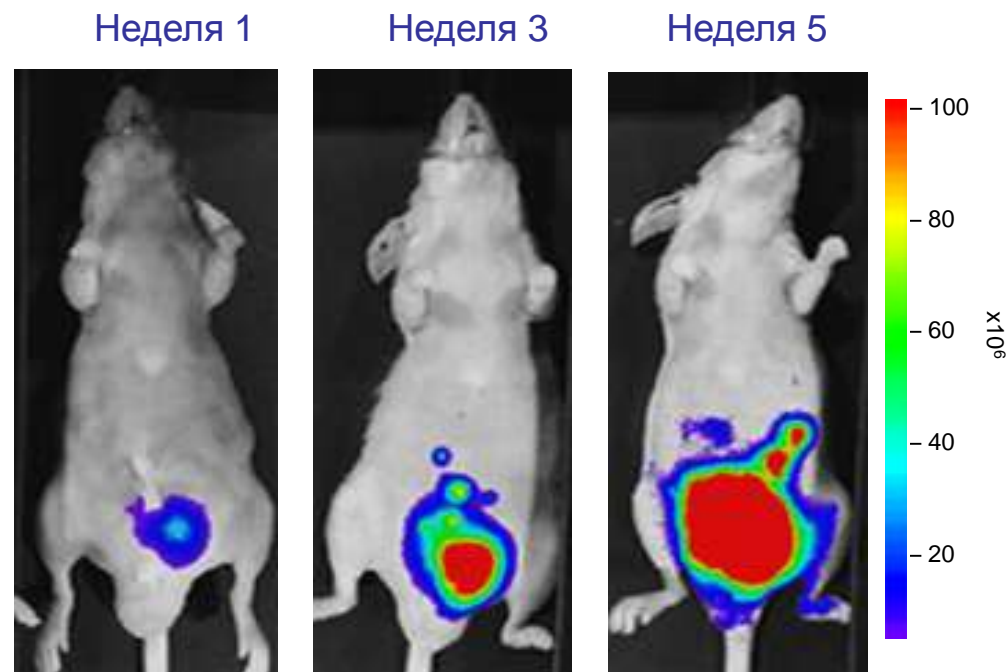
Многофункциональные
модули для
животных

Флуоресцентные
красители, *in vivo*



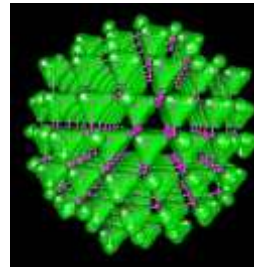
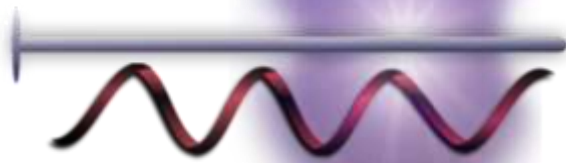
Зачем делается оптический имидж ?

- Оптический имиджинг - технология которая позволяет измерять свет, продуцируемый живыми животными моделями.
- Это позволяет контролировать биологические процессы (экспрессия генов) в реальном времени на живых модельных системах.



Репортерные молекулы

Люцифераза,
флуоресцентные белок



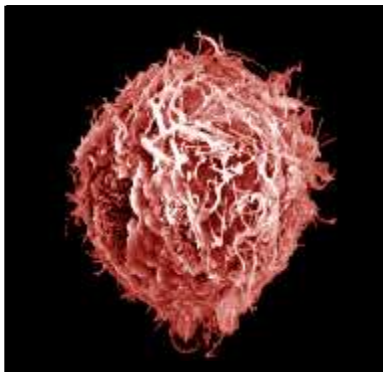
Квантовые точки

Флуоресцентные красители

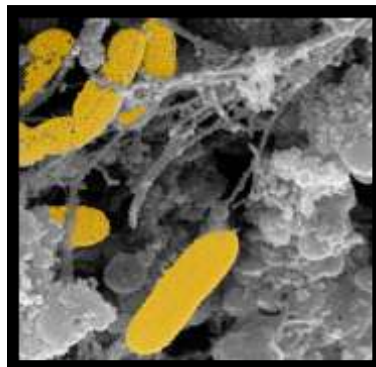


АТФ и O₂ требуется для Люциферазы

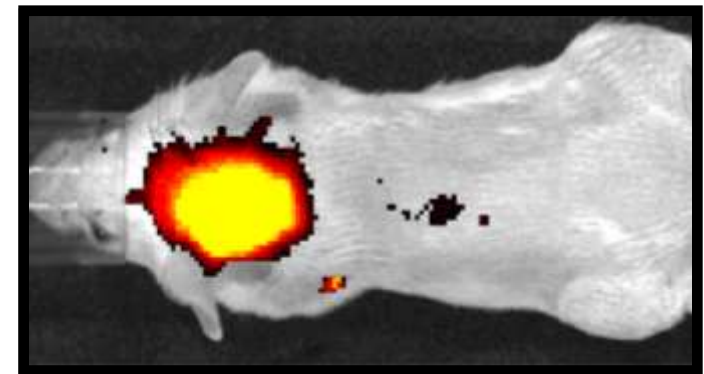
Меченные клетки



Меченные бактерии



Меченные гены



Почему оптический имидж?

***In vivo* контролирование и мониторинг опухолевых-клеток, стволовые клетки, бактерии**
Изучение функций генов

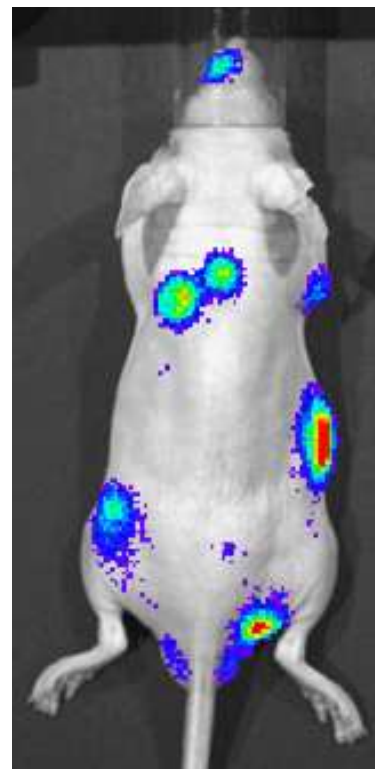
- Свет продуцируется трансгенными животными

Идеально для имиджинга небольших животных

- Небольшая глубина тканей
- Довольно простое оборудование
- Нет радиации
- Легко обучаться

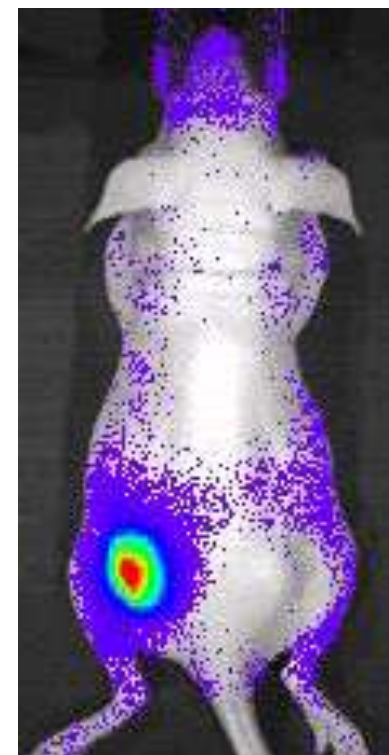
Количественная оценка – испускаемый свет пропорционален количеству меченных клеток

Биололюменесценция



B16F10-luc
меланома
метастазы

Флуоресценция



PC3M клетки
меченные с
красителем
PKH-26

Lumina III: система детекции флуоресценции/биолюминесценции



Lumina III XR: система с рентгеновским излучением



Kinetic III: система с режимом высокоскоростной съемки в реальном времени



Ivis-Spectrum: система количественной 3-х мерной визуализации



FMT: система для флуоресцентной томографии



Ivis Spectrum CT: система 3-х мерной количественной визуализации с возможностью компьютерной томографии



Maestro 2: полностью автоматизированная системы для флуоресцентной томографии

Quantum FX: система для проведения компьютерной томографии



Maestro EX: система для детекции флуоресценции



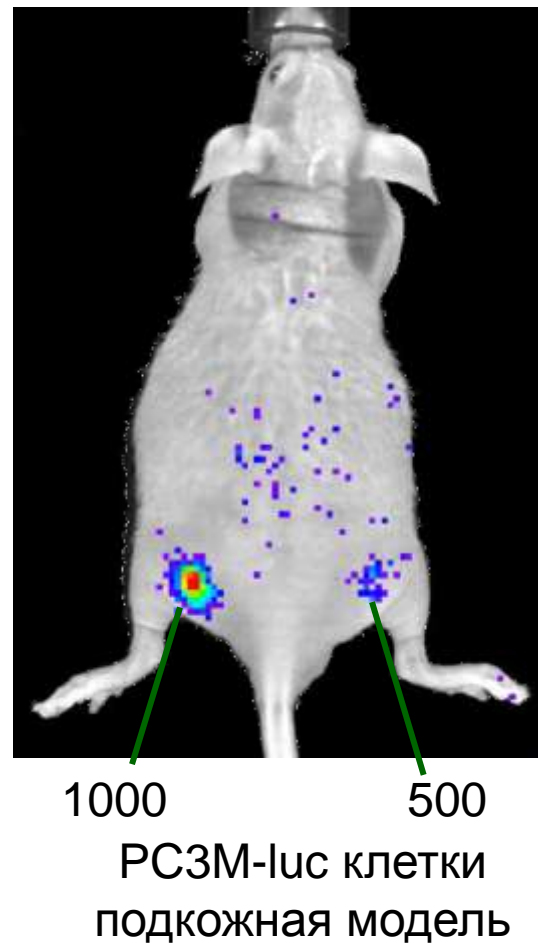
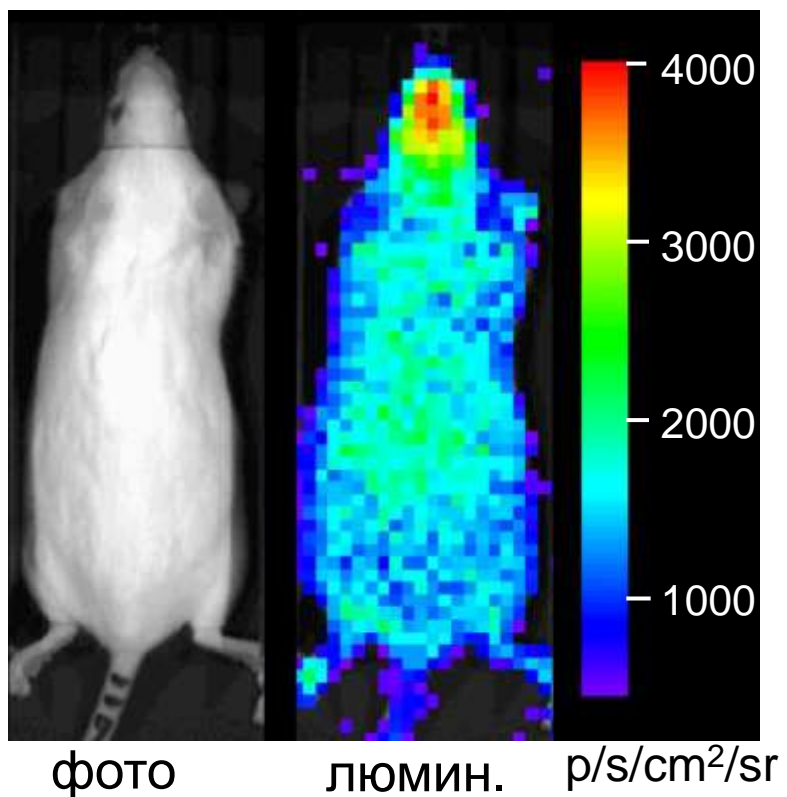
система детекции флуоресценции/биолюминесценции



Биолюминесцентный ИМИДЖИНГ

Чувствительность билюминесцентной детекции

Низкий уровень фона аутолюминесценции в живых моделях

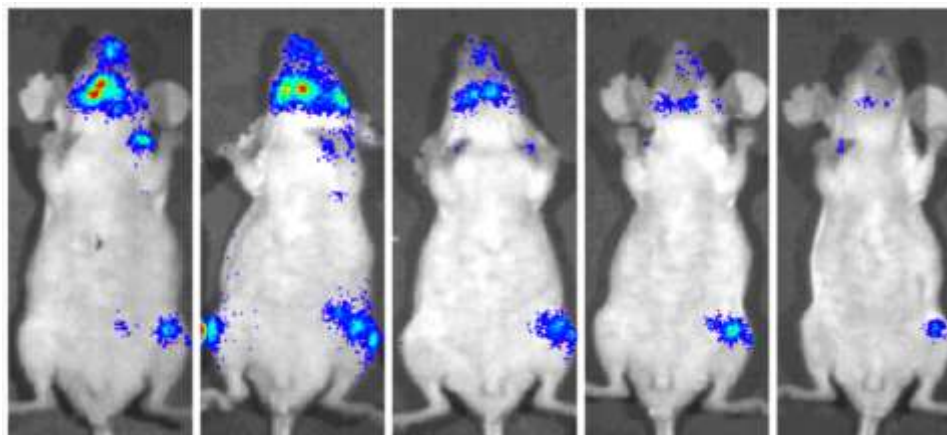


Онкология: Экспериментальная метастатическая модель

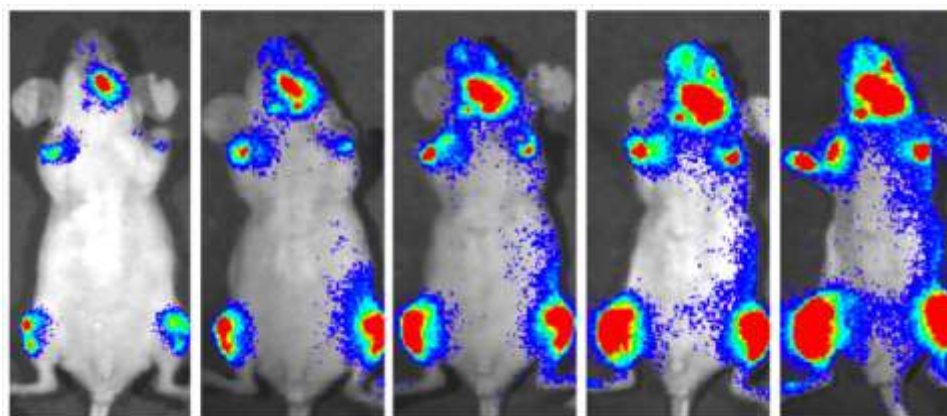
PC-3M-luc (3x10⁶ клеток, интракардиальное введение)

день 20 день 23 день 27 день 30 день 34

Paclitaxel
Начало на 20 день



Placebo



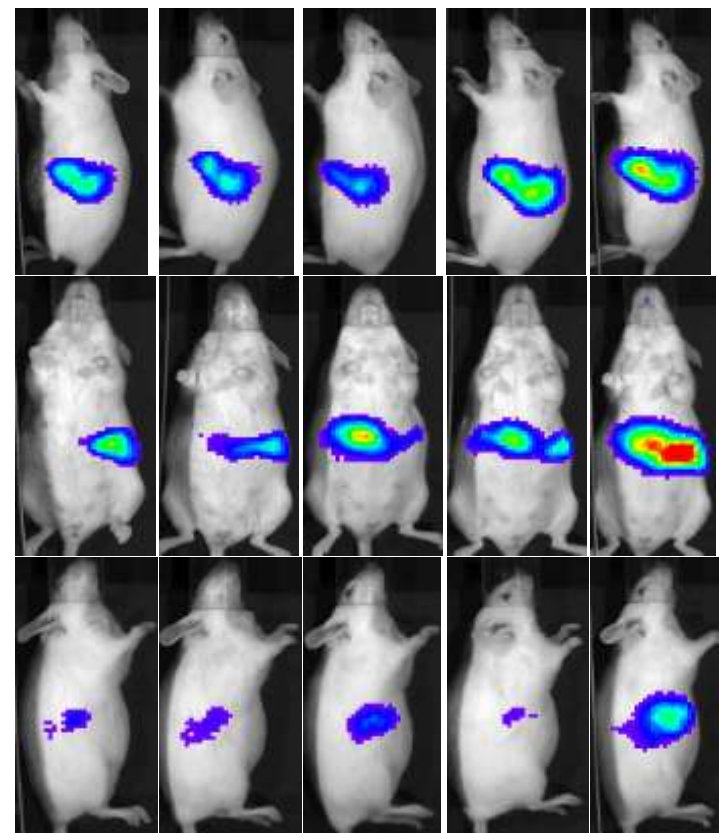
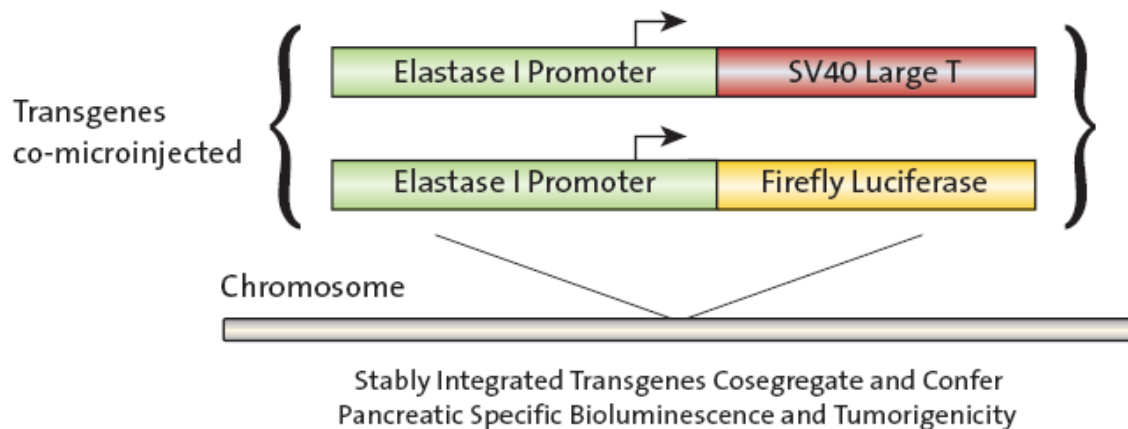
Источник: Корпорация Novartis
Институт для биохимических исследований / Xenogen Corporation

Трансгенные животные:

Модель (панкреатической аденокарциномы): EL1-Luc/EL1-TAg мышь (OncoMouse®)

Эластаза I обеспечивает трансгенную экспрессию
в Асинар клетках поджелудочной железы

человеческая
панкреатическая аденокарцинома

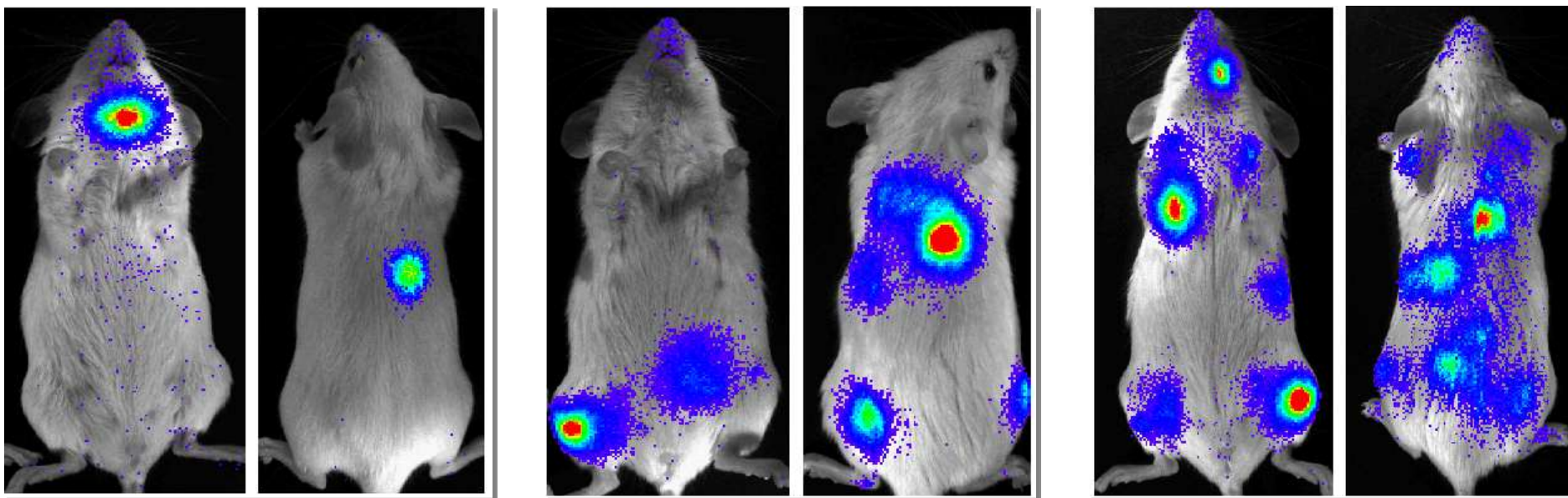


6 weeks 7 weeks 8 weeks 9 weeks 10 weeks

Трансгенные животные: адаптивный трансфер

используются донорские клетки и ткани из конститутивных LPTAs
(трансгенных мышей, продуцирующих свет)

Привитые фракции HSC (гемопозитические стволовые клетки)



10 HSC

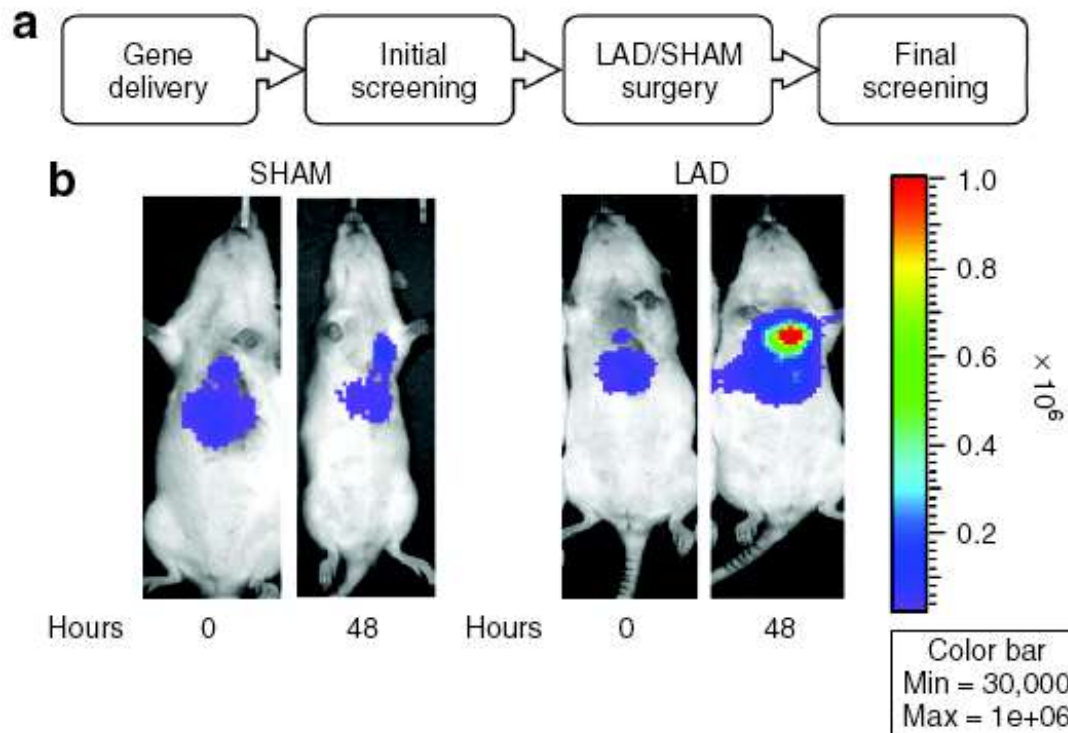
50 HSC

250 HSC

Cao *et al*, 2004

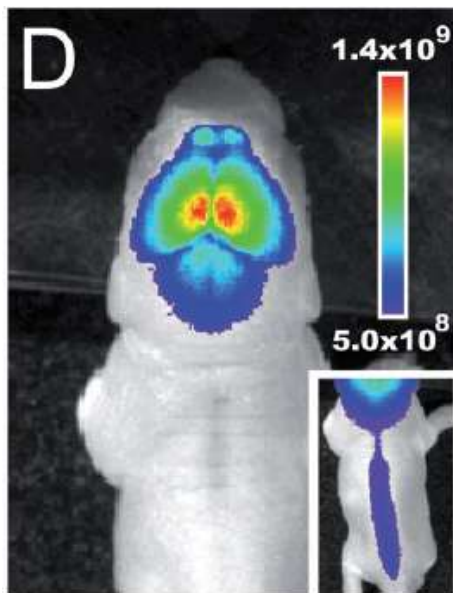
Кардиология: неинвазивный мониторинг гипоксии в сердечной мышце, после ишемической болезни

Уникальная вектор-основанная система, регулирующая гипоксию с двойными кислород-чувствительными транскрипционными элементами, была разработана для быстрой и надежной гипоксия-регулируемой экспрессии генов в сердце



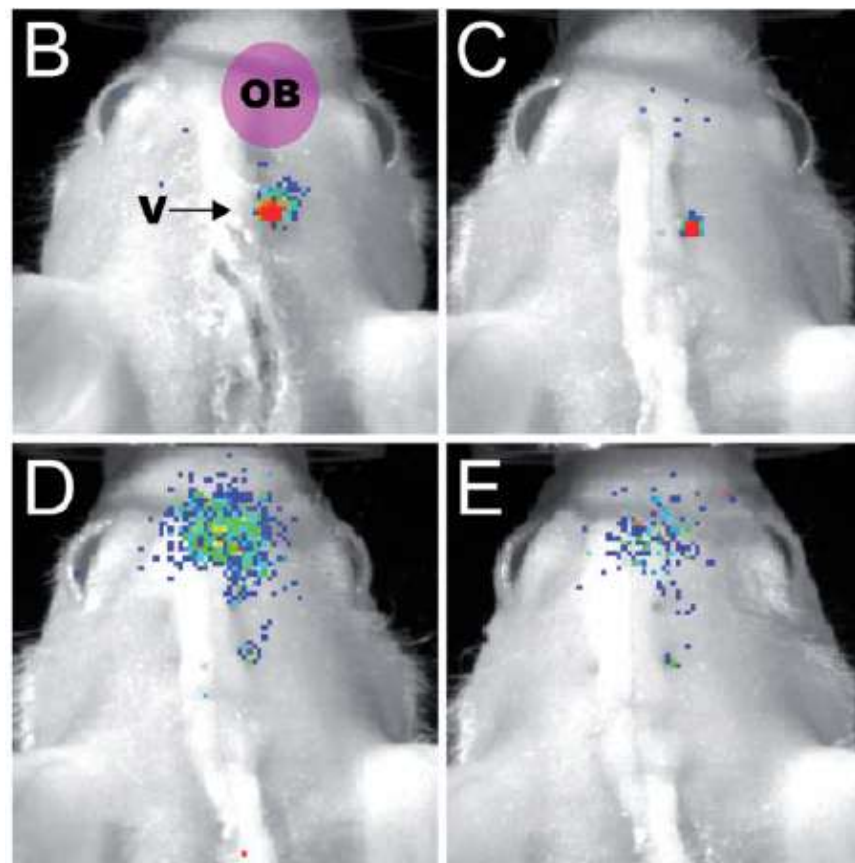
Нейрология: Оптический имиджинг при нейрогенезе

Doublecortin (DCX) специфически быстро экспрессирующийся в популяции нейрональных клеток-предшественников и молодых нейронов



Однодневная опухоль DCX-промолюцеферазная мышь

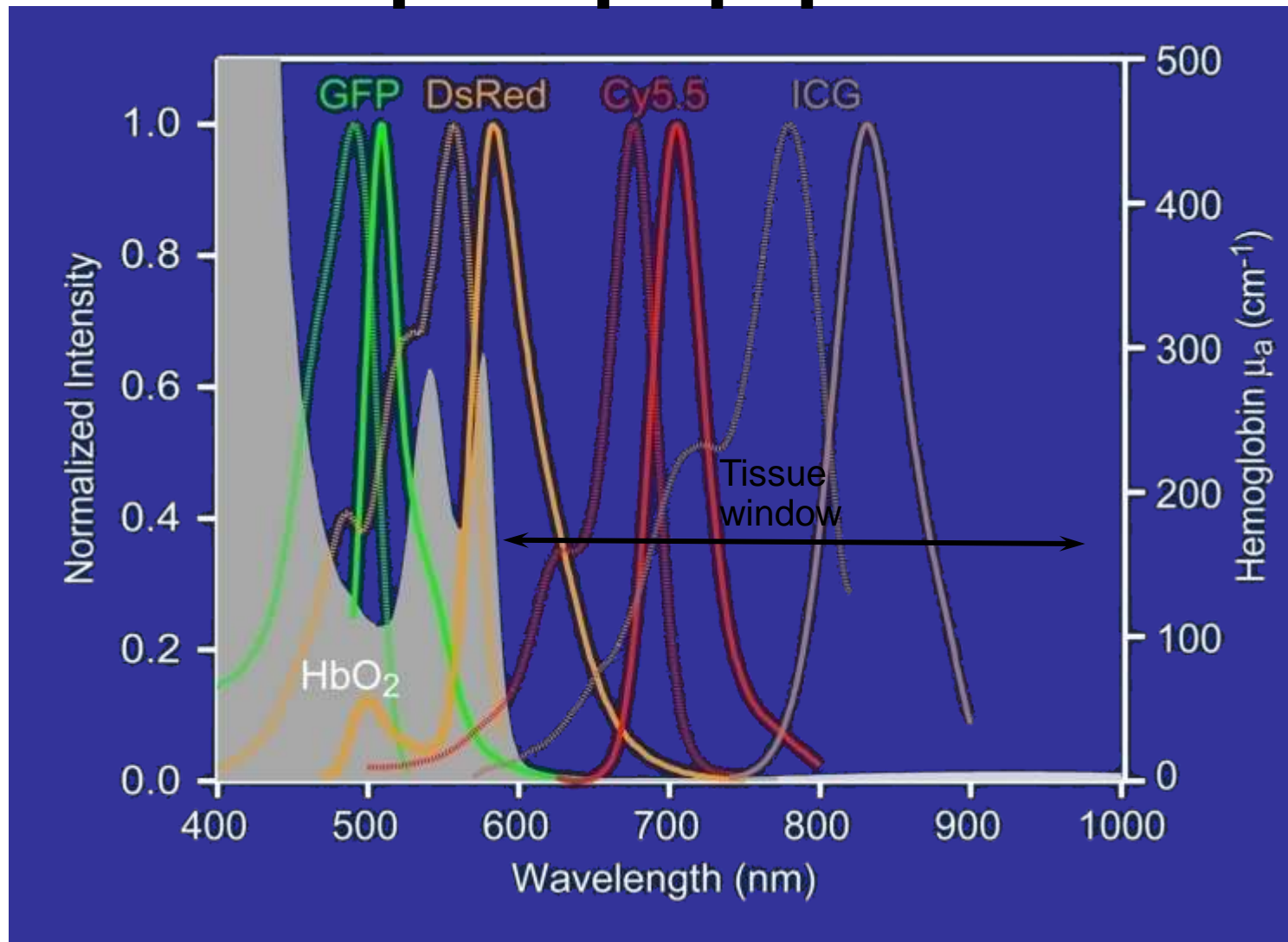
Couillard-Despres *et al.* 2008



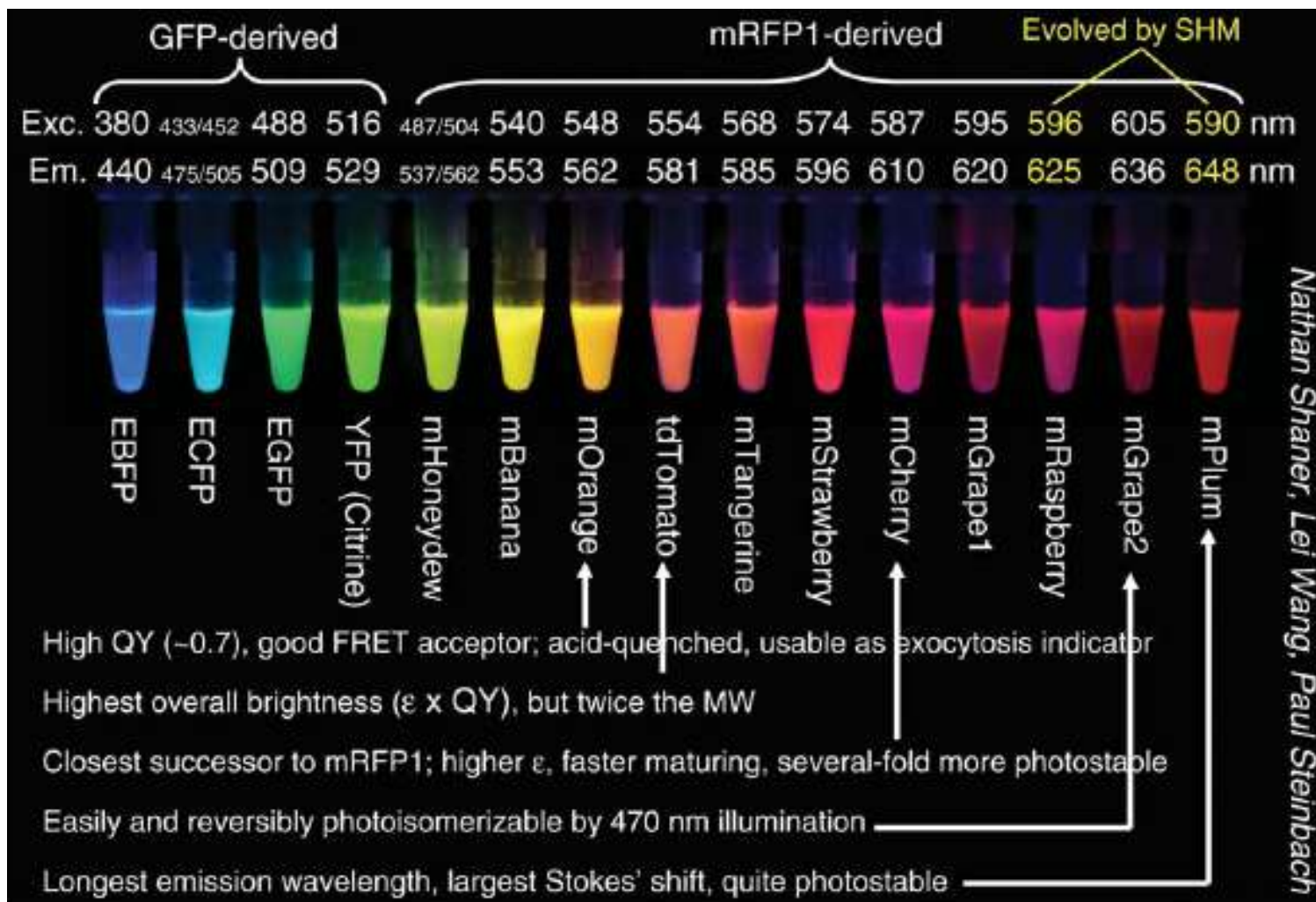
10^5 нейронных клеток-предшественников были введены в правый желудочек сердца NMRI Nu/Nu мыши. Наблюдаемое перераспределение: (B) 6 дней, (C) 8 дней, (D) 10 дней, и (E) 12 дней после трансплантации клеток

Флюоресцентный Имиджинг

Флюоресцентный спектр общеизвестных флюорофоров



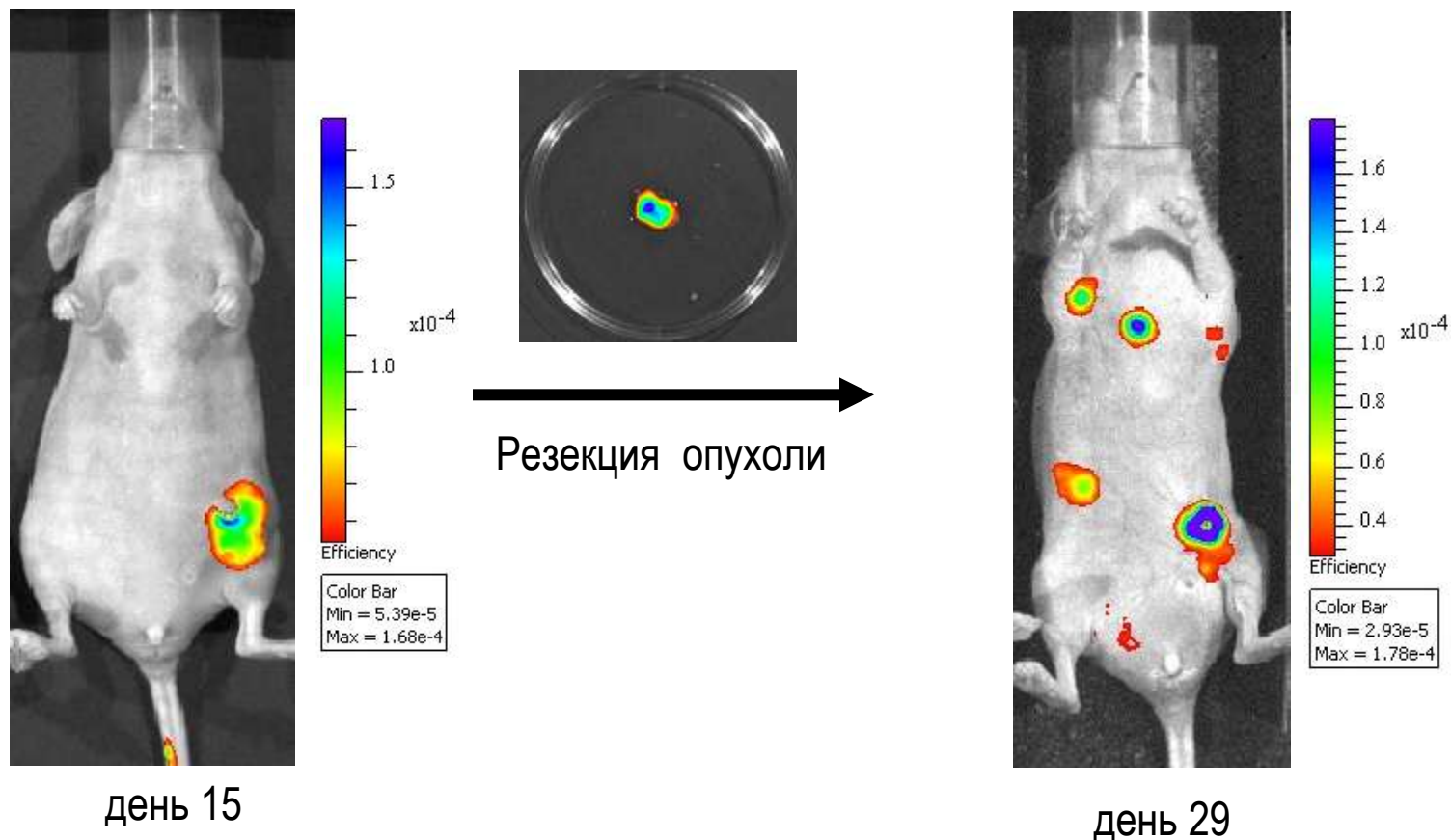
Палитра используемых флюоресцентных белков



Roger Tsien 2005

Bioware Ультра *красный*

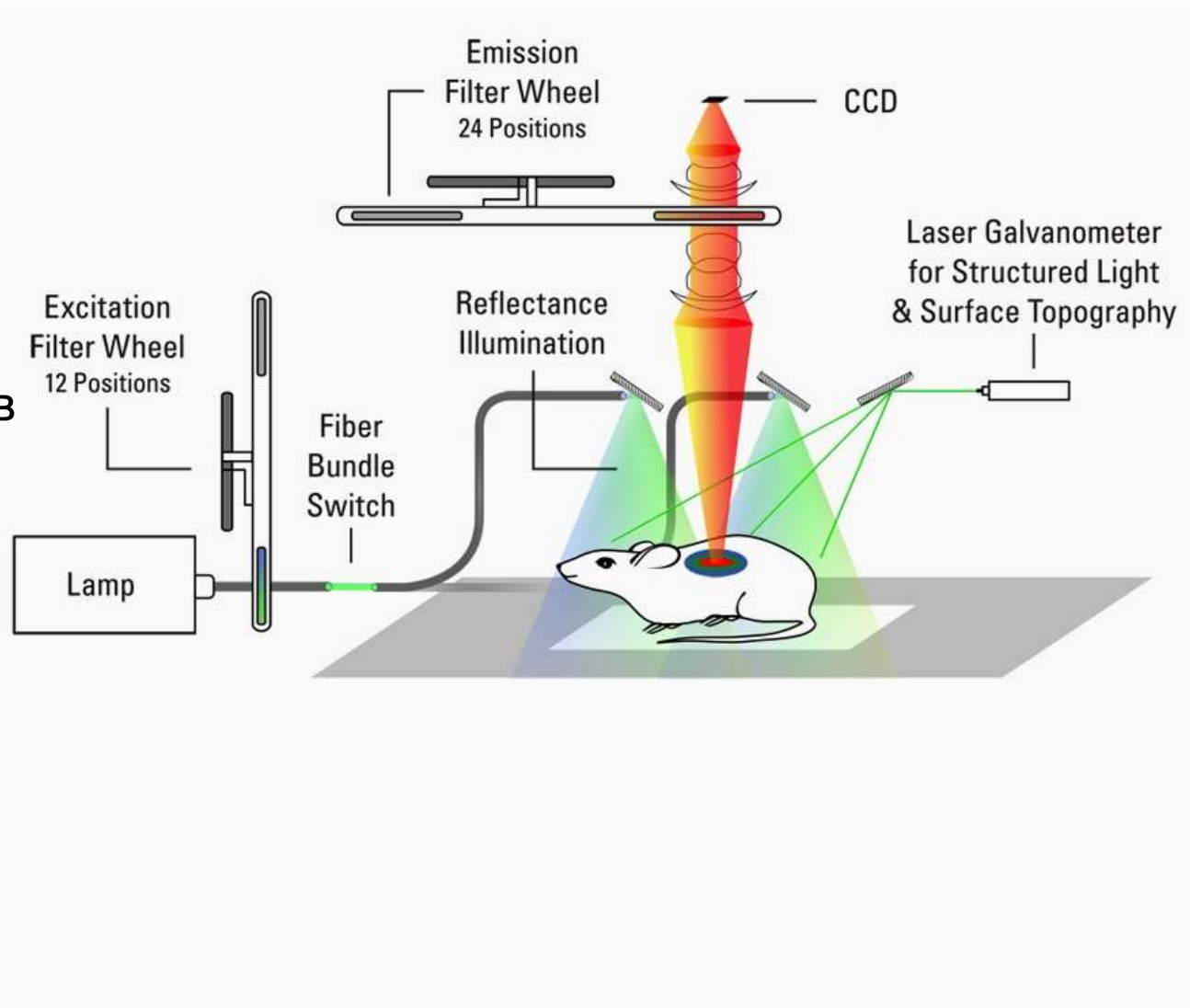
Рост ортотопической опухоли (клеточная линия 4T1-tdTomato)



Изучение процесса образования множества метастазов после резекции первичной опухоли

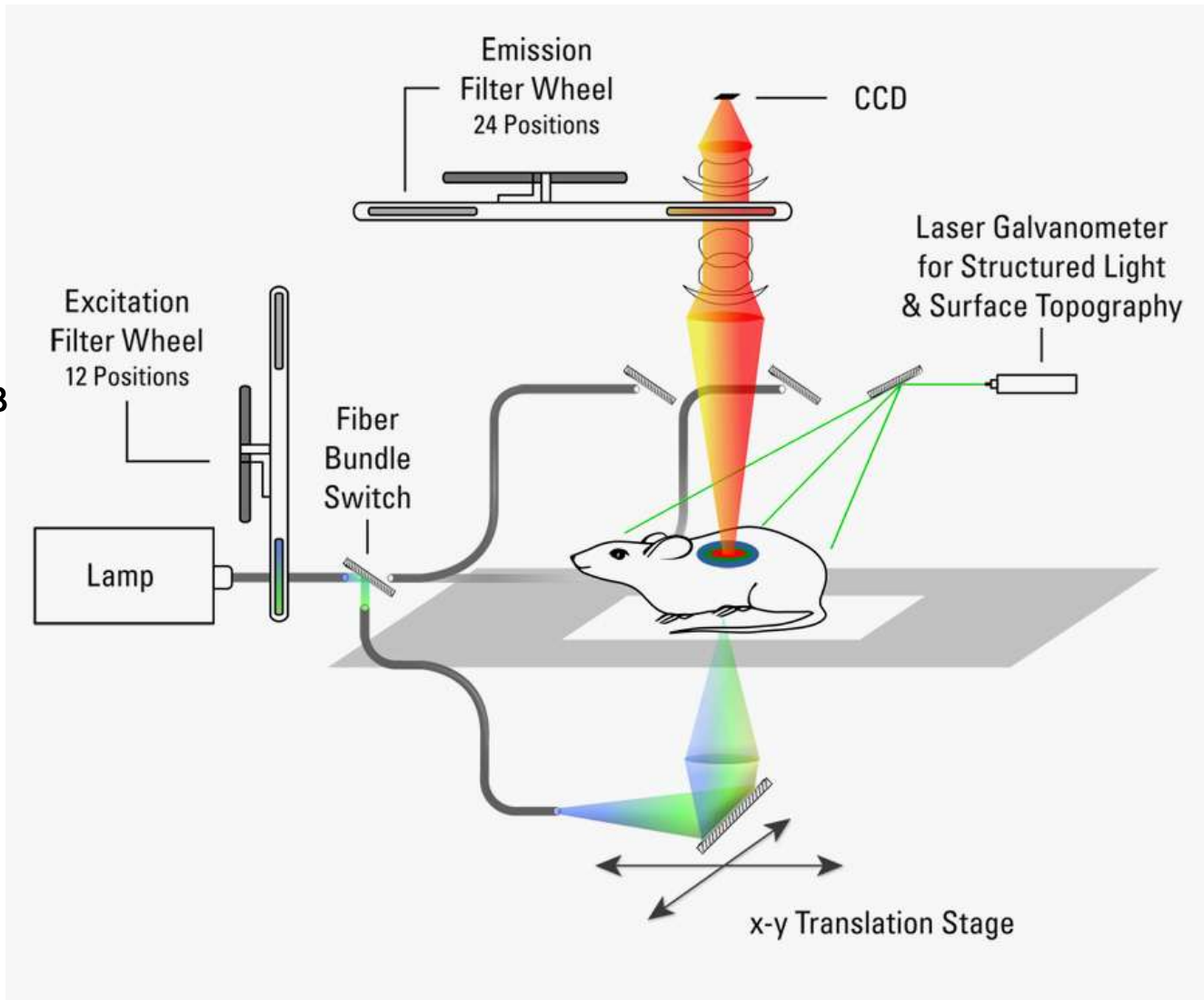
IVIS Spectrum

Режим работы в
отражённом
свете



IVIS Spectrum

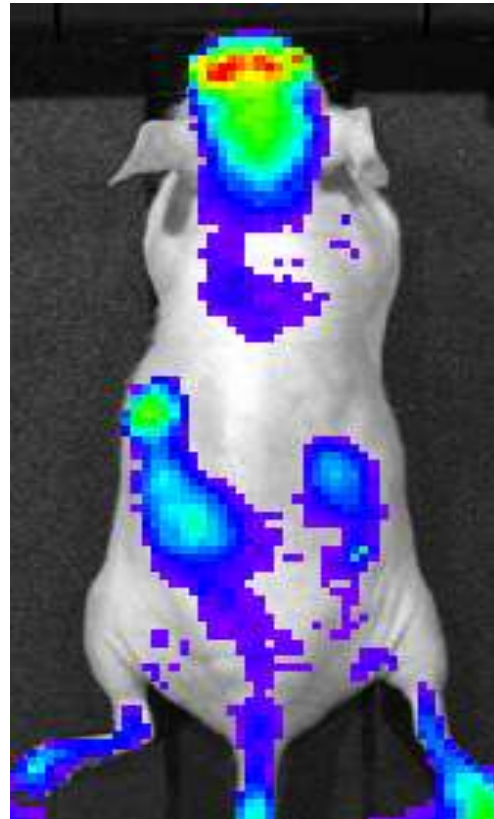
Режим работы в
проходящем
свете
(трансиллюминация)



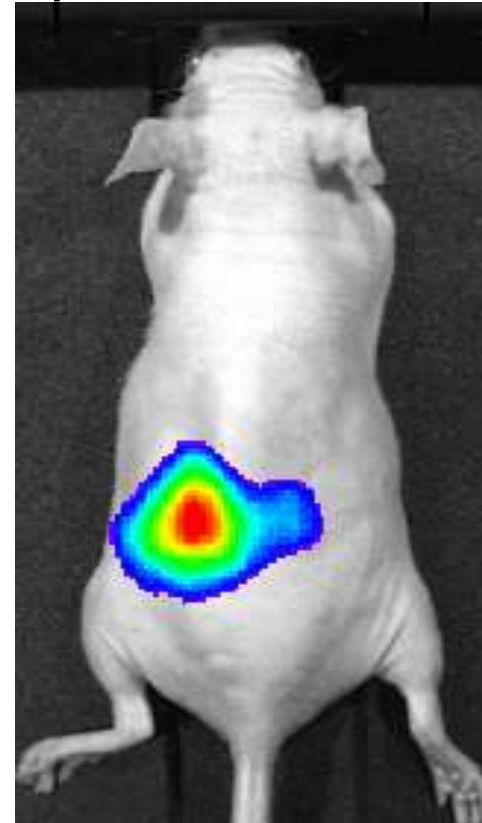
Трансиллюминация AlexaFluor 680

Клетки Pillow имплантированы в левую почку, 1×10^{15} молекул

Ері-иллюминация Трансиллюминация



sig/ bkg=1.10



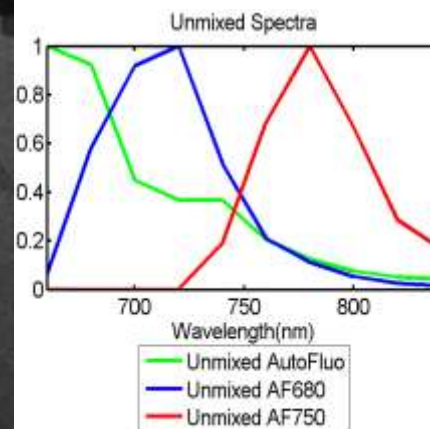
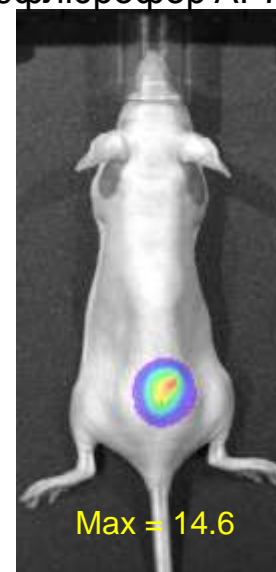
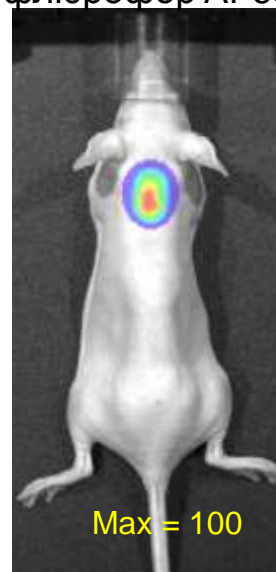
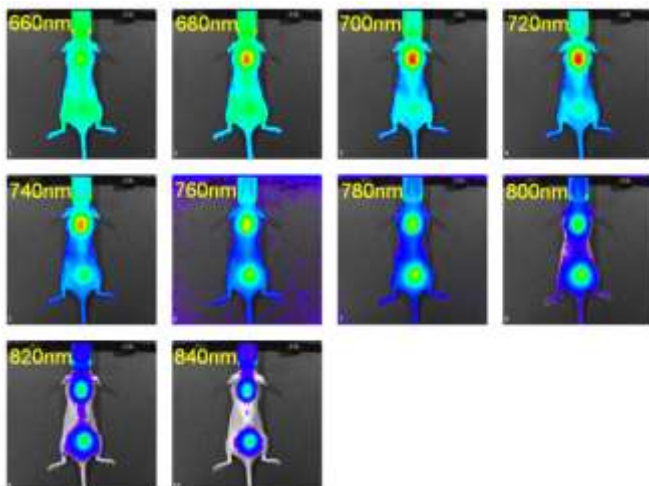
sig/ bkg=1.10

Мультимодальный Имиджинг

Спектральное разделение Alexafluor 680/750

флюорофор AutoFluor флюорофор AF680 флюорофор AF750

Исходные спектральные данные



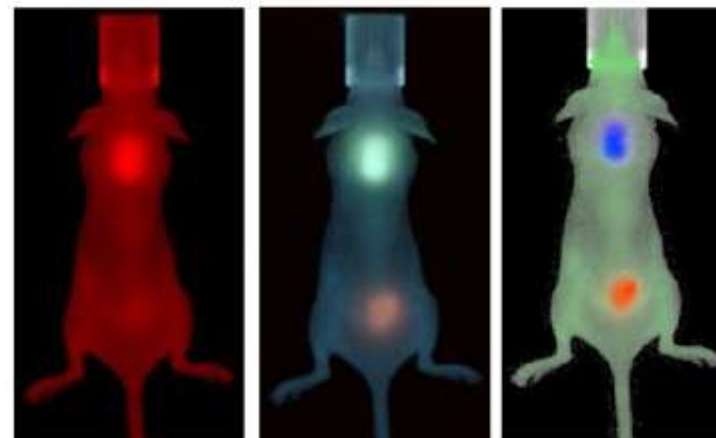
Подкожные инъекции 10^{14} молекул Alexafluor 680 и Alexafluor 750

Режим работы в отражённом свете

Real RGB

Adaptive RGB

Composite

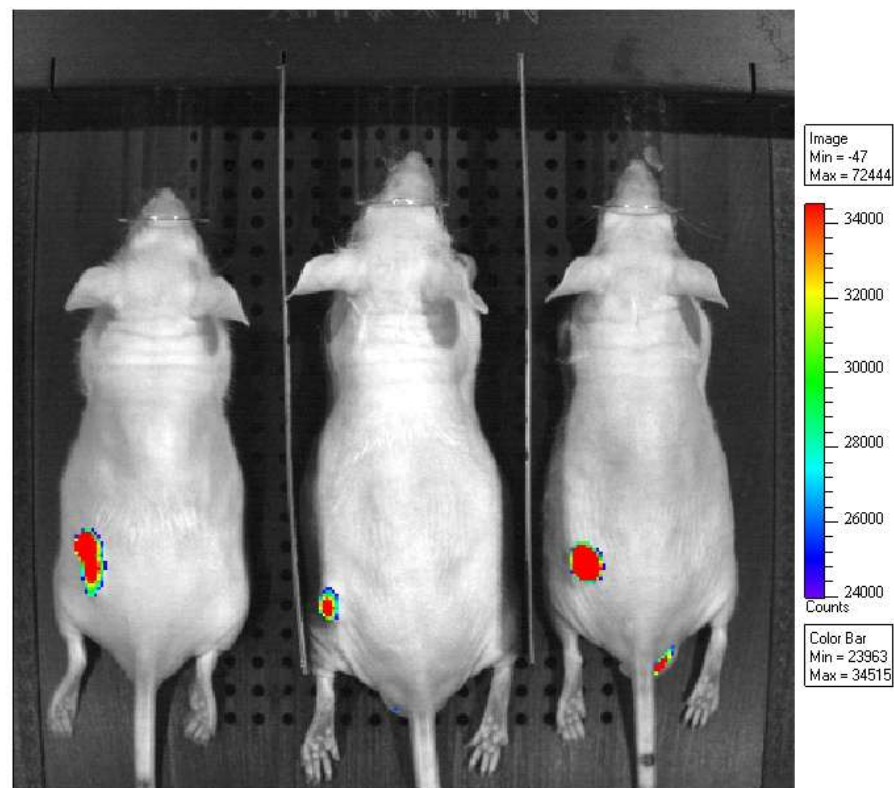
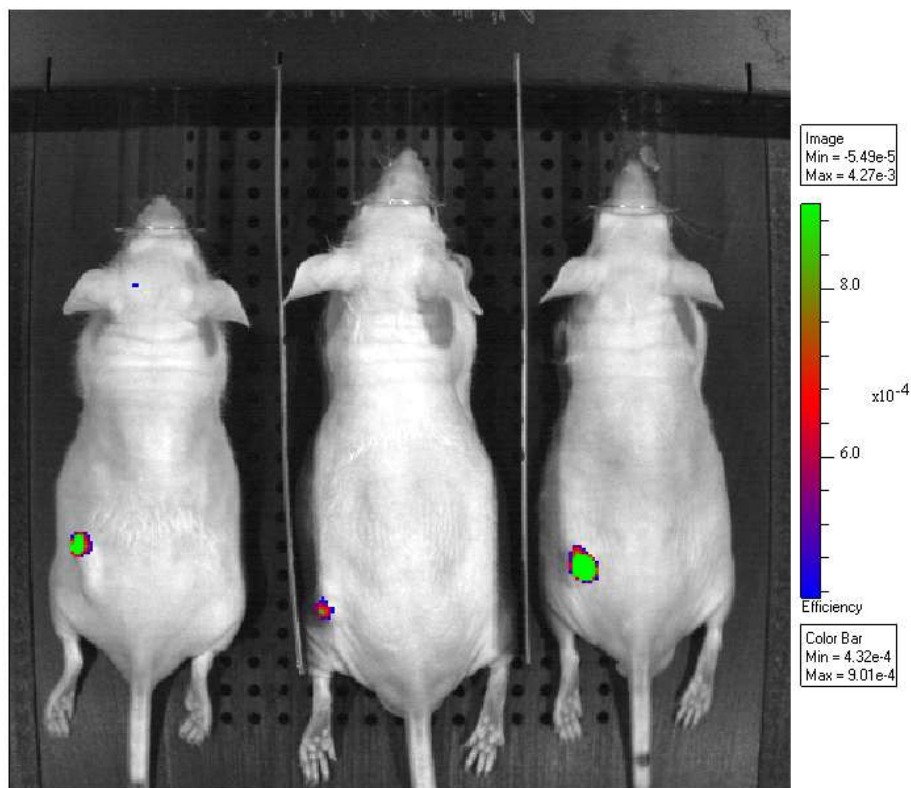


Мониторинг развития опухоли и ангиогенеза

Регистрация флюоресценции и биолюминесценции

Флюоресцентный имиджинг опухоли

Биолюминесцентный имиджинг VEGFR2



VEGFR2-luc KI мышам были привиты 1 миллион LL/2-GFP опухолевых клеток. Изображения получены на 18 день

Использование любых продуктов или материалов, содержащих кодирующую последовательность мутантного белка из *Aequorea victoria* требует лицензионного соглашения с компанией GE Healthcare UK Limited

Томографический Имиджинг

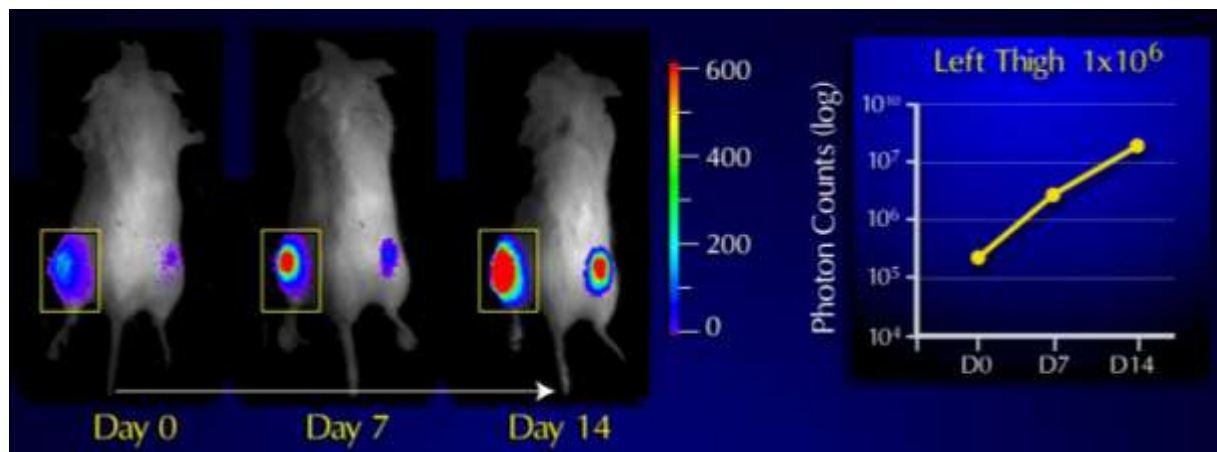
3D-диффузная томография

Мониторинг и контроль

Относительное измерение

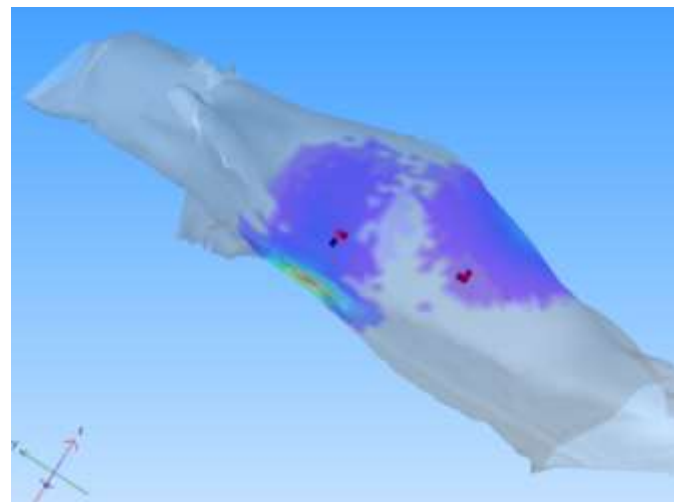
- Нельзя сравнивать опухоли с разной локализацией

PC-3M-luc рост опухоли



3D Томография

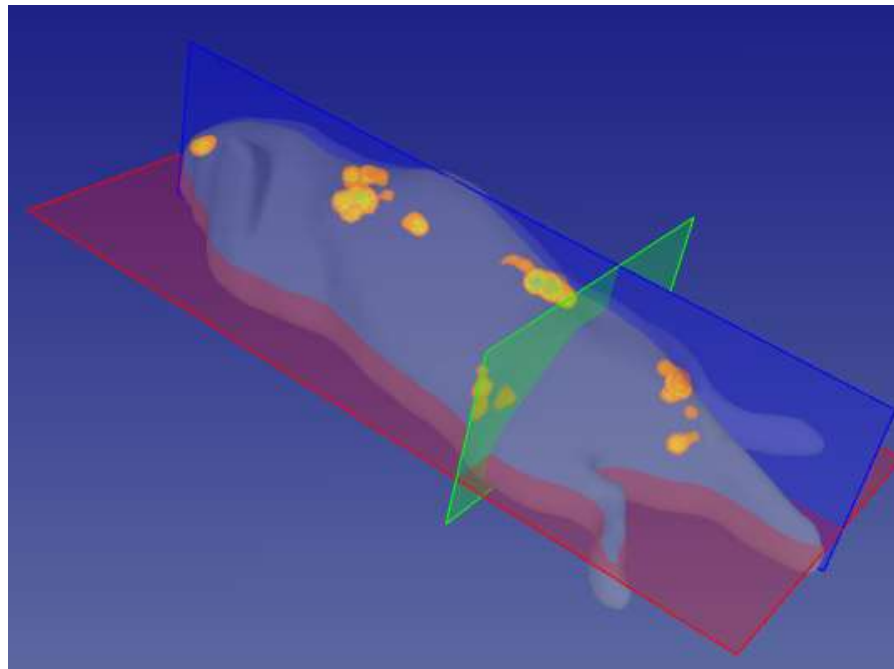
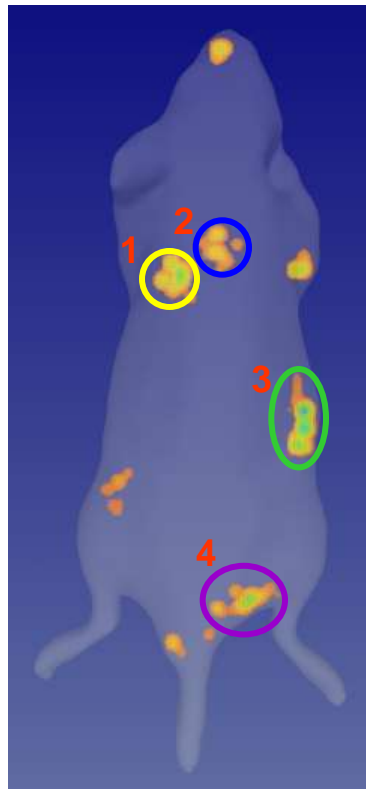
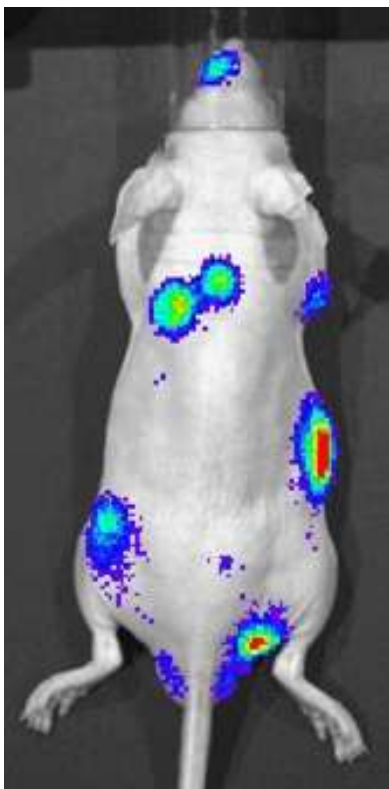
- Возможность получить количественную оценку и выявить 3D локализацию по цветовой интенсивности исследуемого района
- Рассеянная люминесцентно-имиджинговая томография (DLIT™)
- Требуется мульти-множественный вид /спектральные имиджи
- Возможное разрешение ~1-3 мм



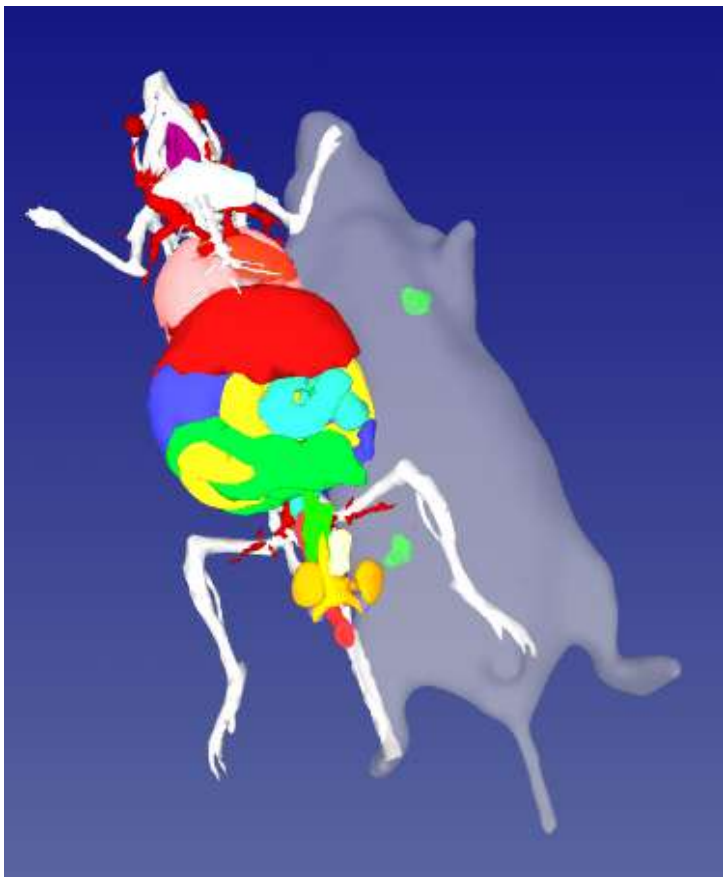
Метастазная модель меланомы B16F10

Вид со спины

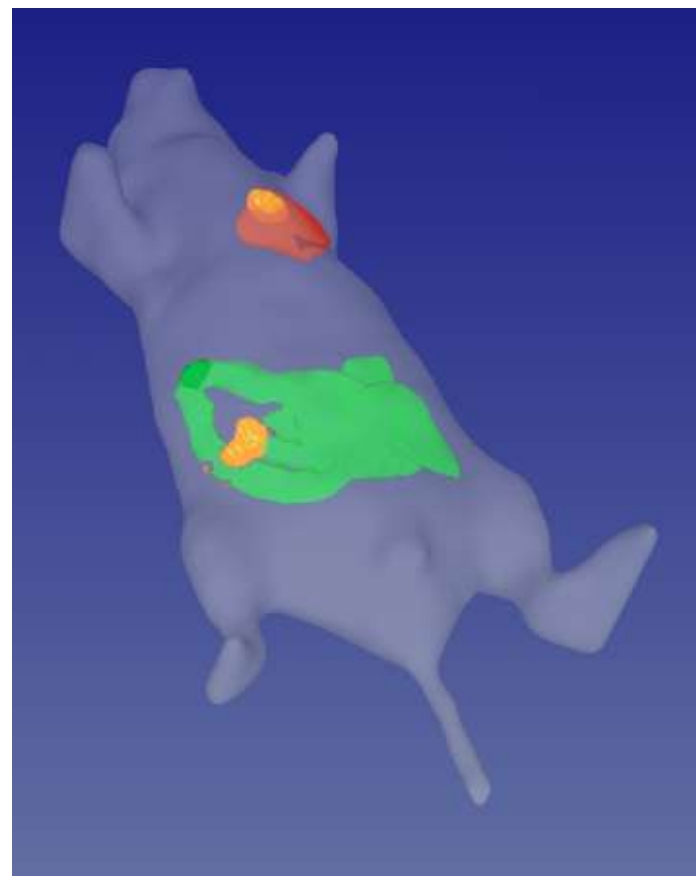
- 5×10^5 клеток (внутривенное введение)
 - снято на 17 день
- Используется 5 фильтров (560-640 nm)



Автоматическая регистрация исследуемого изображения с изображением из атласа органов мыши Наличие цифрового атласа в программном обеспечении LI4.0



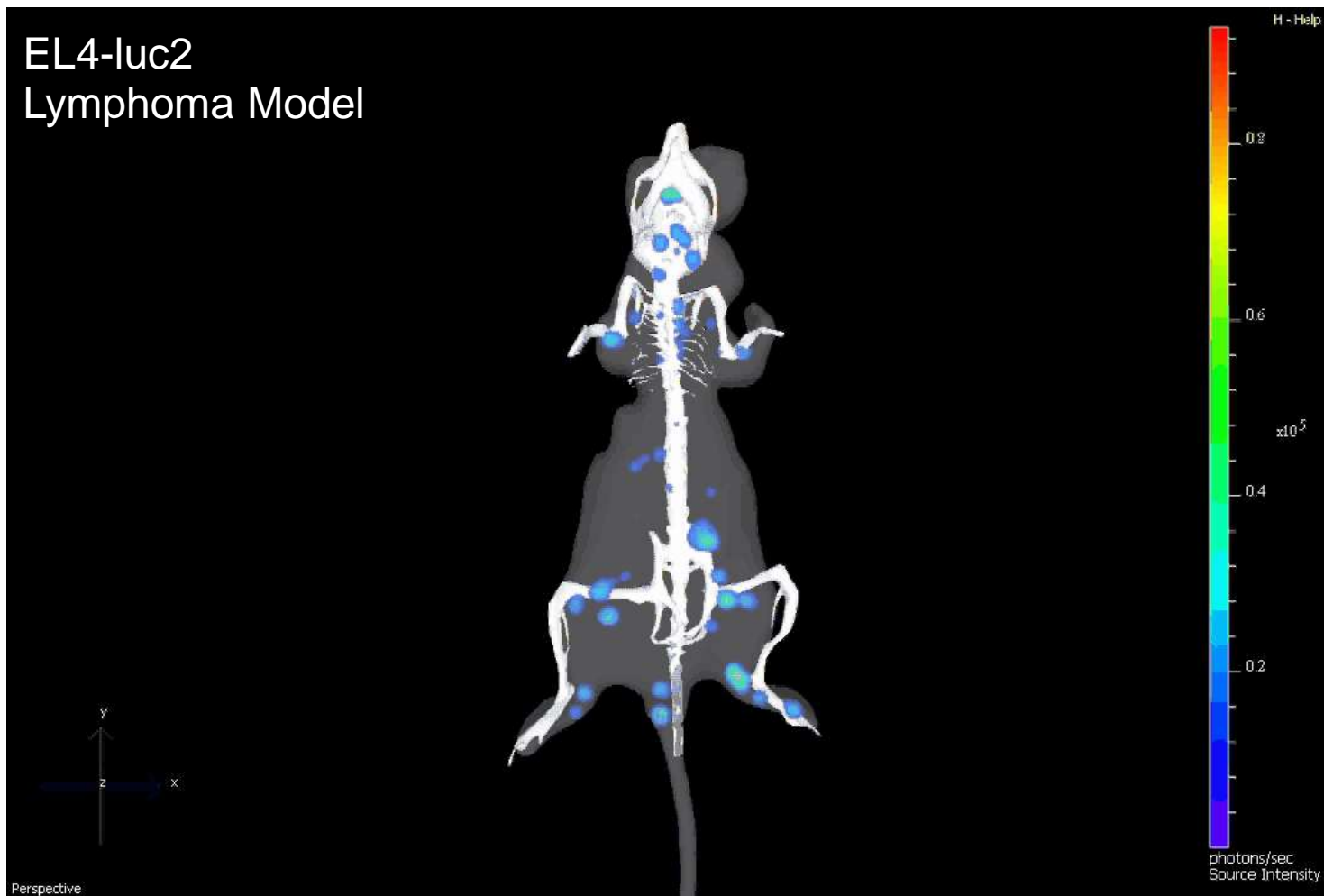
Отдельные изображения

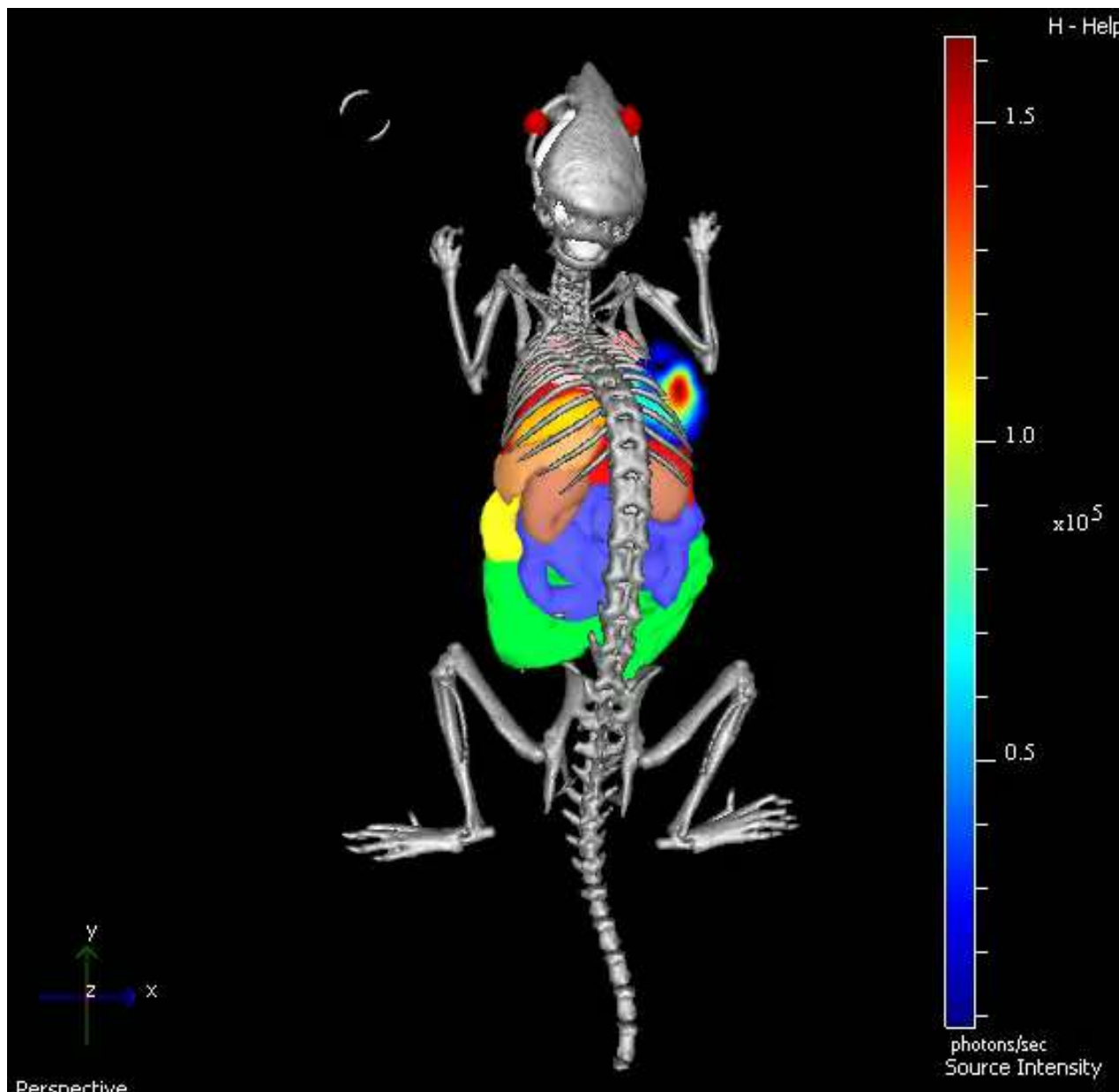


Наложение изображений

3D Биолюминесценция

Сопоставление изображения экспериментальной мыши с анатомическим атласом

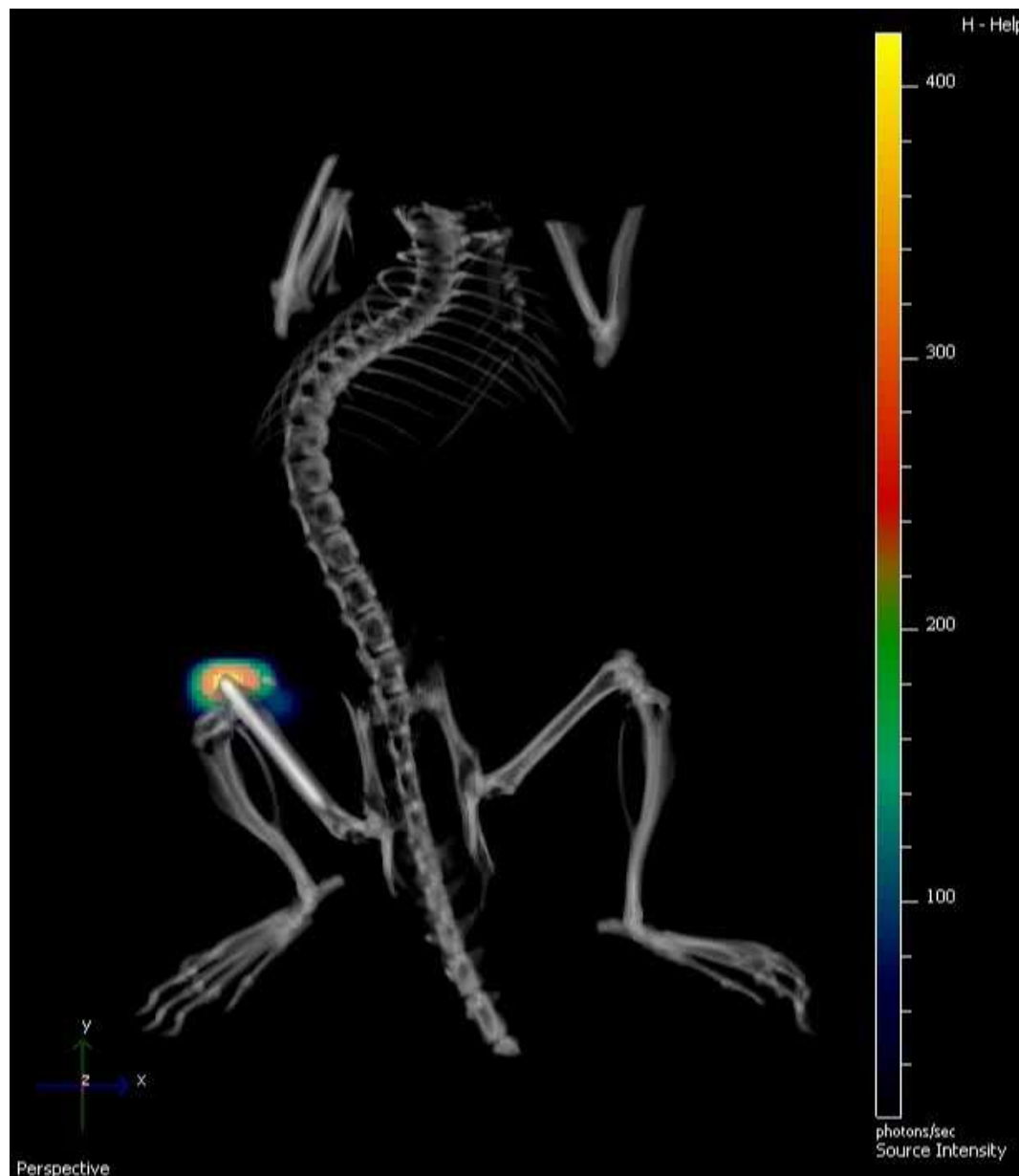






Perspective





ID:7

Study:20101027

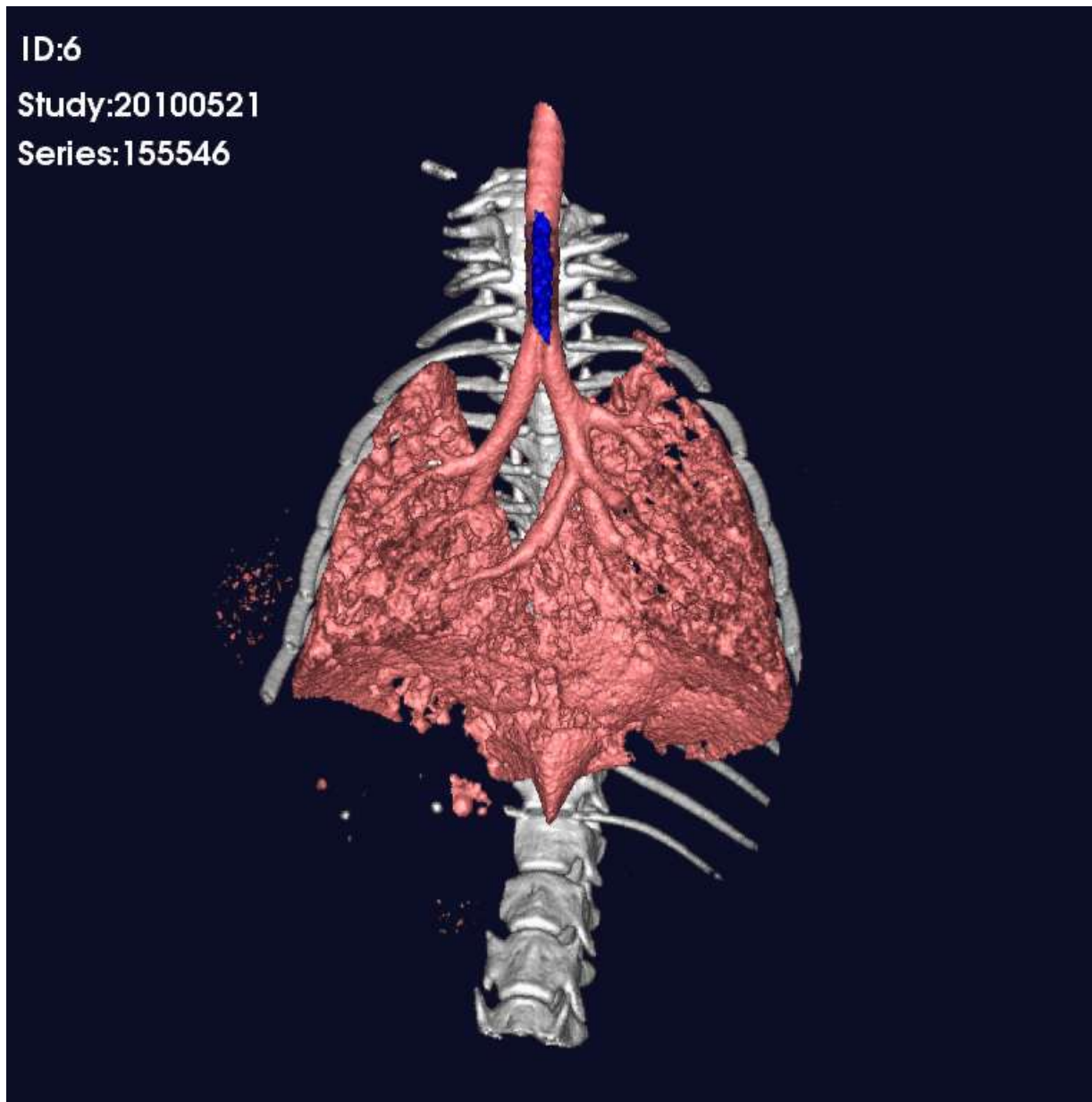
Series:161343



ID:6

Study:20100521

Series:155546





Официальный представитель компании Caliper a PerkinElmer Inc.

«ЗАО Приборы - Pribori Oy»

Москва, 109028 Певческий пер., 4, стр.1,

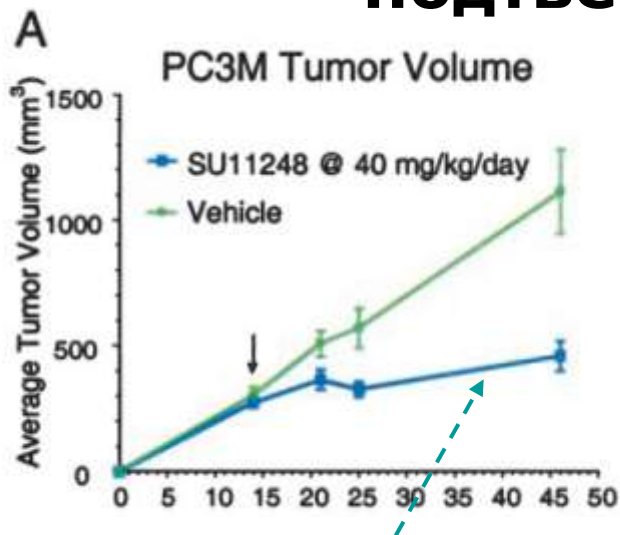
Тел. (495) 937-45-94

факс (495) 937-45-92

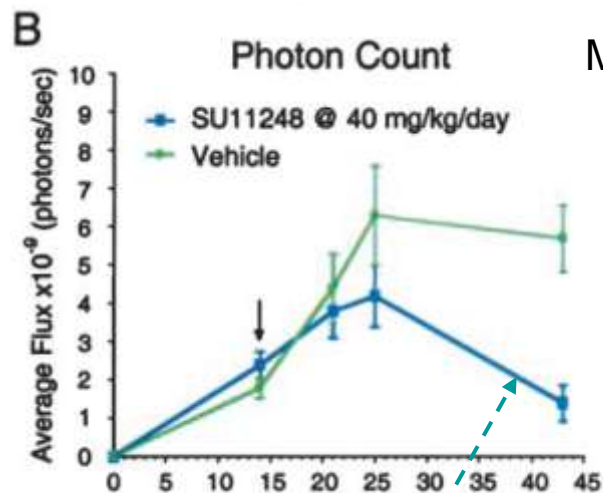
www.pribori.com



Фармакология: данная технология получила подтверждение FDA

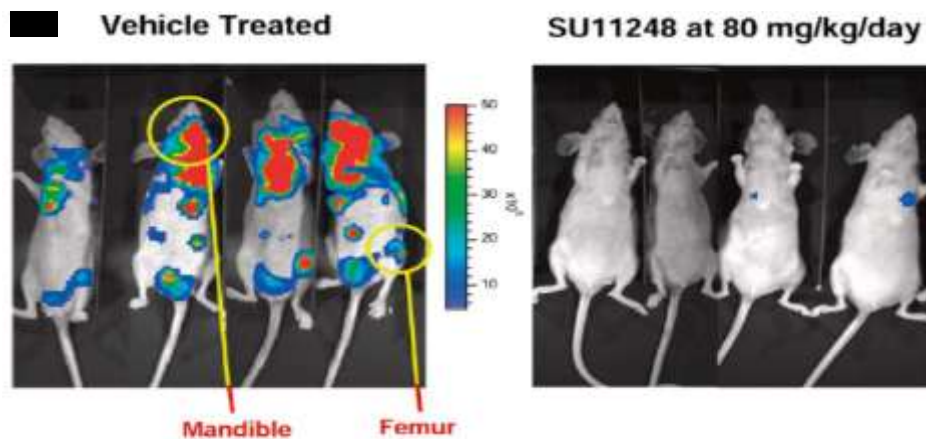


Физическое измерение
(опухоль все еще становится больше)



Mendel *et al* 2003

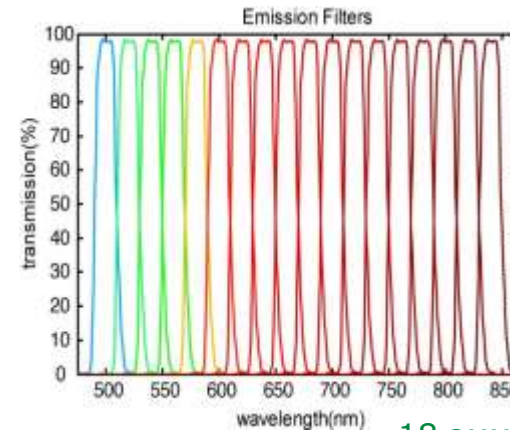
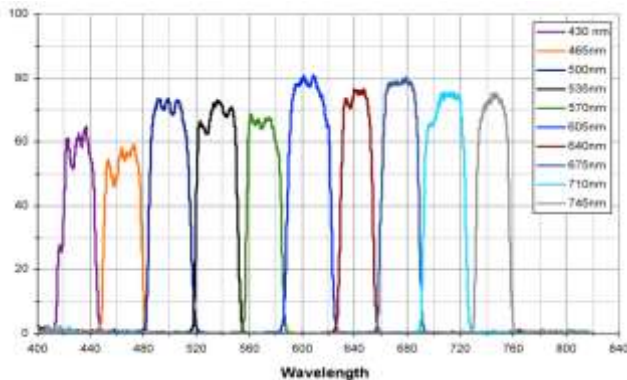
Биофотонный имиджинг
(опухолевые клетки уже убиты)



Murray *et al* 2003

Спектральное разделение

Современные фильтры и возможность установки оптических линз на заказ дает возможность получать высокое спектральное разрешение и проводить спектральное разделение с высокой точностью и чувствительностью



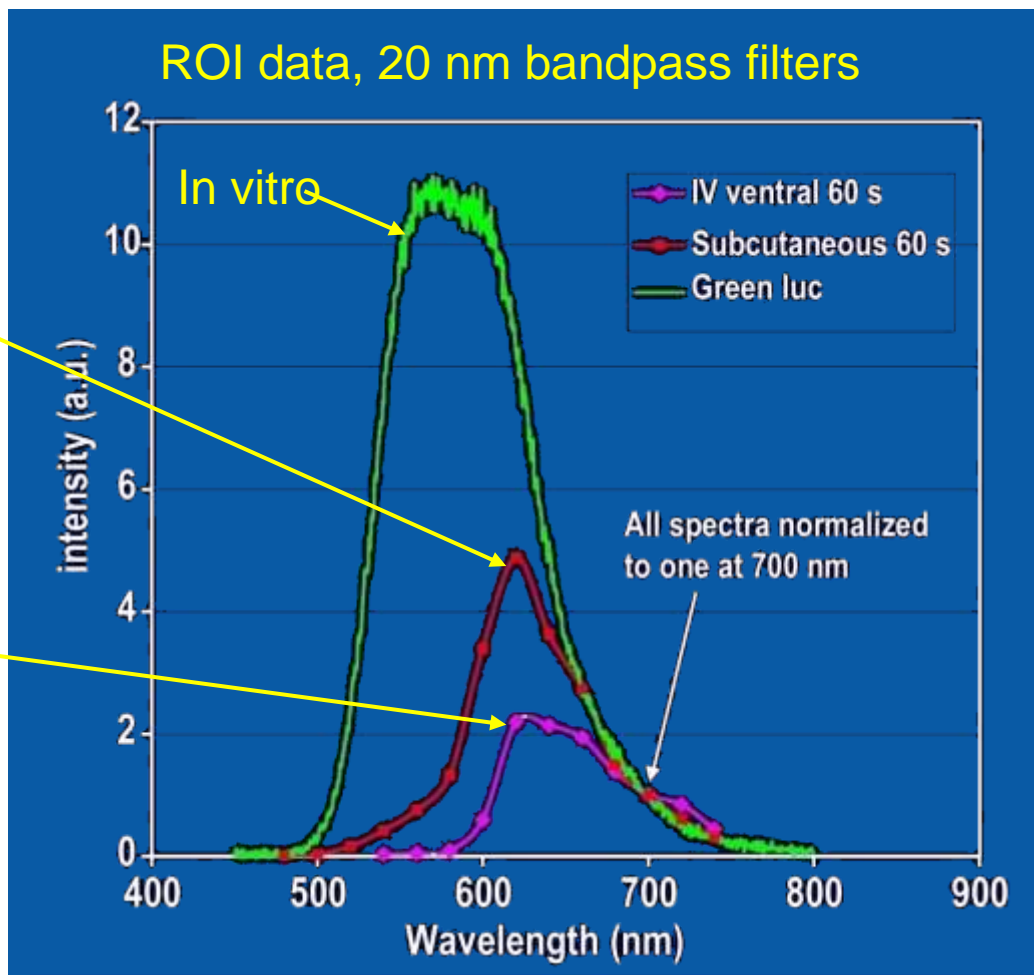
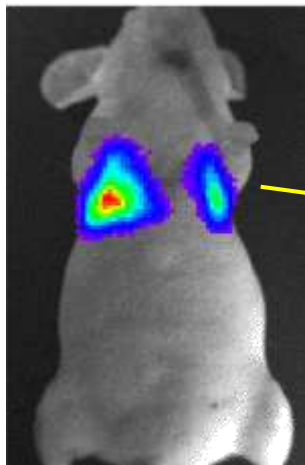
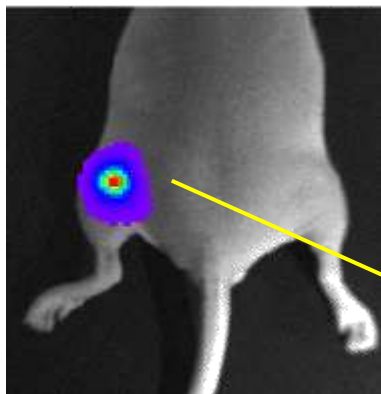
10 фильтров возбуждения

18 эмиссионных фильтров

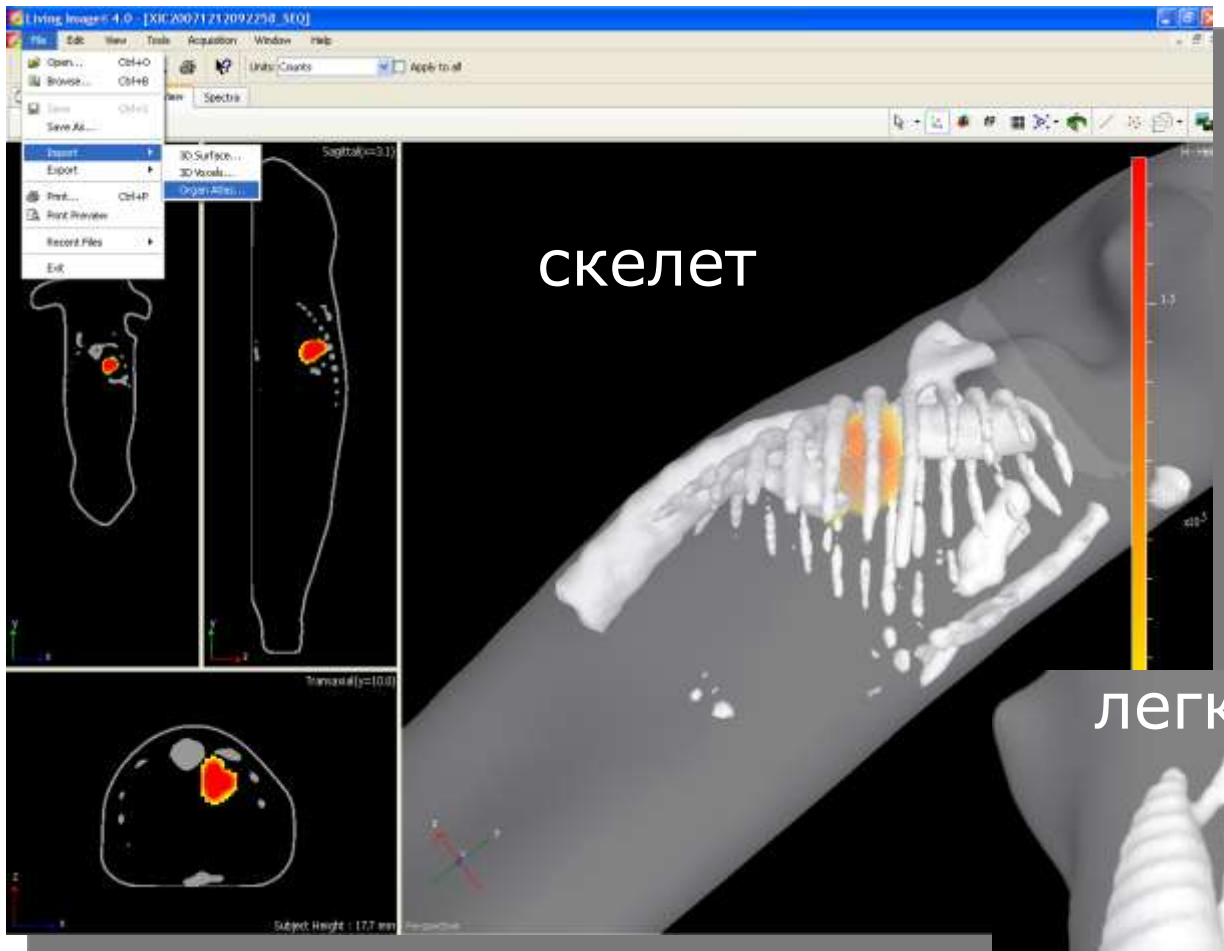


- $1e^{-8}$ OD блокирующие фильтры
- 95% пропускания
- Фильтры вставлены в жесткую конструкцию (колесо) для получения лучших результатов и обеспечения более высокой прочности конструкции

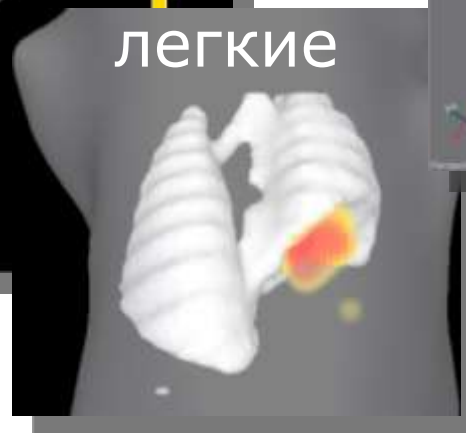
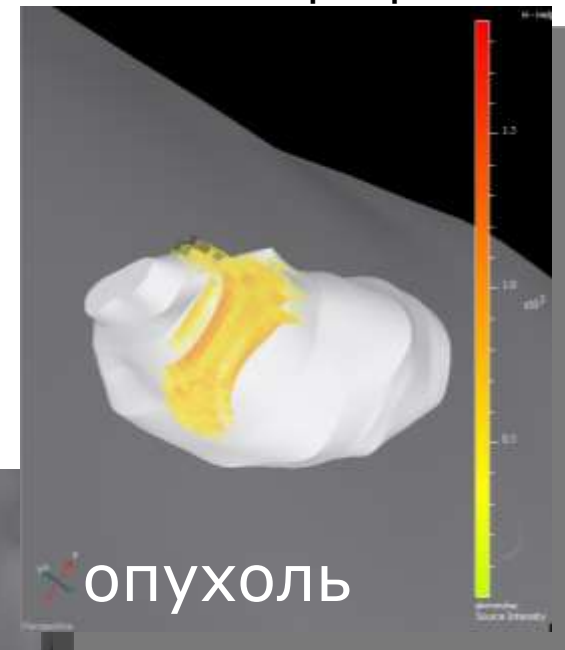
Спектральные измерения позволяют получить информацию о глубине нахождения источника свечения в животном



Наложение изображений, полученных на СТ или MRI системах с молекулярными изображениями



Открываются в формате программы (.iv)



IVIS[®] Имиджинговые системы

Флюоресцентный и биолуминисцентный имиджинг



Характеристики	IVIS Lumina	IVIS Kinetic	IVIS Lumina XR	IVIS 200 / Spectrum
Количество животных	3 мышки	3 мышки	3 мышки	5 мышей
CCD размер (мм)	13	13 (EMCCD)	13	26
CCD темп ° C	-90	-90	-90	-90
FOV (см)	5 - 12	5 - 12	5 - 12	4 - 25
Флюоресценция	Да	да	Да	Да
Кол-во фильтров	3 x 8	3 x 8	3 x 8	24
3D возможность	Нет	Нет	Нет	Одиночный-вид
X-Ray	Нет	Нет	Да	Нет