



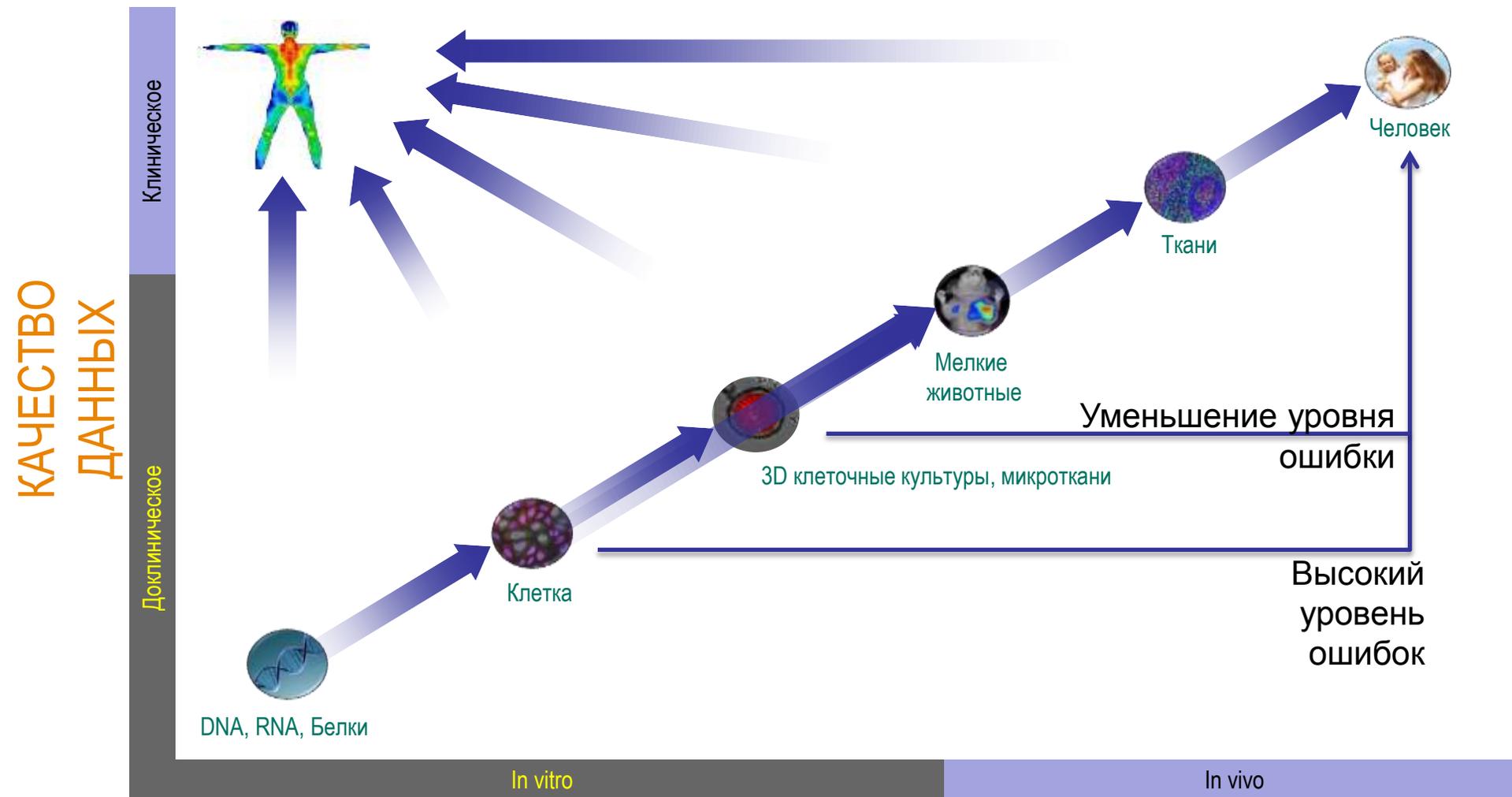
Имиджинг In Vivo

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 displays various scientific instruments and diagrams corresponding to each level of biological organization:

- ДНК (DNA):** Includes a diagram of a DNA double helix with a label 'HRP' and a diagram of a protein-DNA complex with labels 'K₂S₂O₈' and 'HRP'.
- РНК (RNA):** Includes a diagram of a protein-RNA complex with labels 'FRET', 'Eu-Ab', 'Em 605 nm', and 'Ex 320 or 340 nm'.
- Белок (Protein):** Includes a diagram of a protein structure with various isotopes labeled: ¹³C, ³H, ³¹P, ¹⁴C, ³⁵S, ¹⁰¹In, and ¹²⁵I.
- Клетка (Cell):** Includes a diagram of a cell with a label 'FRET' and a diagram of a cell with a label 'Columbus™'.
- Организм (Organism):** Includes a diagram of a cell with a label 'Columbus™' and a diagram of a cell with a label 'Columbus™'.

Scientific instruments shown include: a microscope, a computer monitor displaying a cell image, a printer, a pipette, a centrifuge, a spectrophotometer, a flow cytometer, and a cell culture incubator.

МИКРОСКОПИЯ

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



Velocity®
Программное
обеспечение для
работы с 3D
изображениями

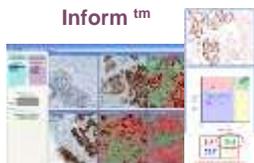


Columbus™ Серверное
программное обеспечение
для работы с данными и
проведением анализа

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



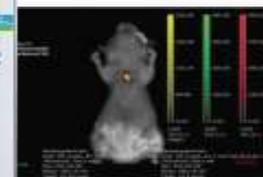
Velocity 3D Image
Программное
обеспечение

**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*



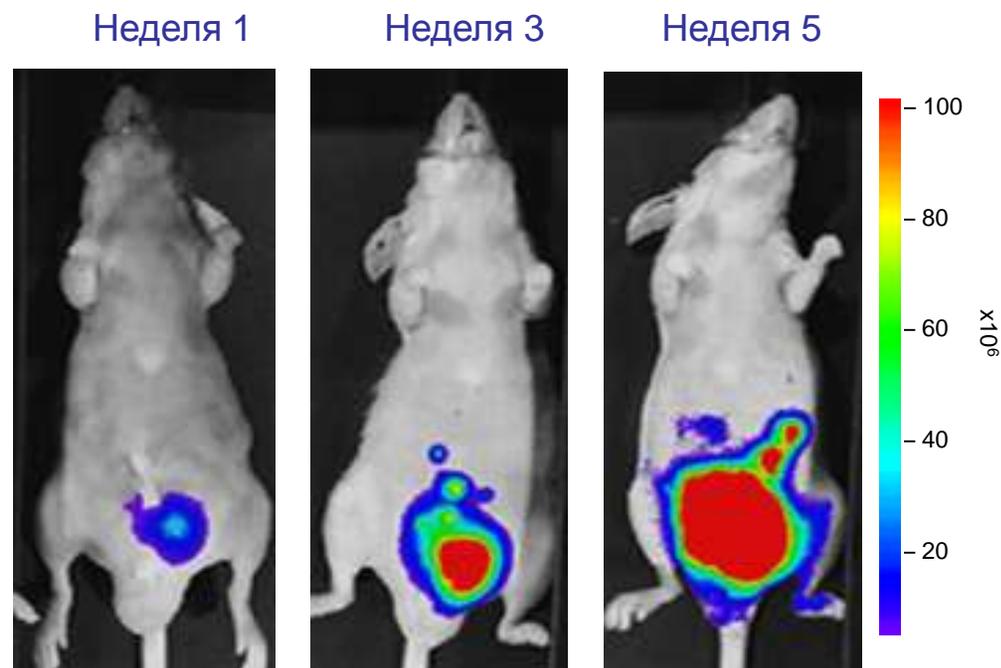
Многофункциональные
модули для
животных

Флуоресцентные
красители, *in vivo*



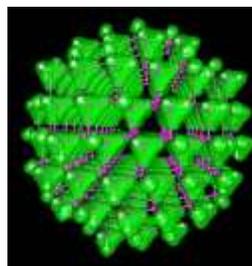
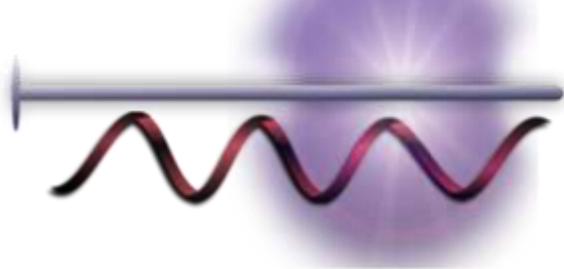
Зачем делается оптический имидж ?

- 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



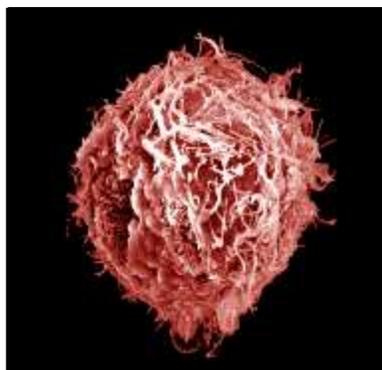
Квантовые точки

Флуоресцентные красители

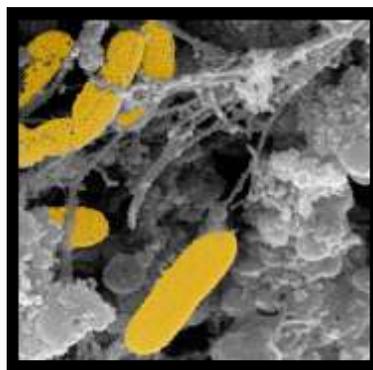


АТФ и O₂ требуется для Люциферазы

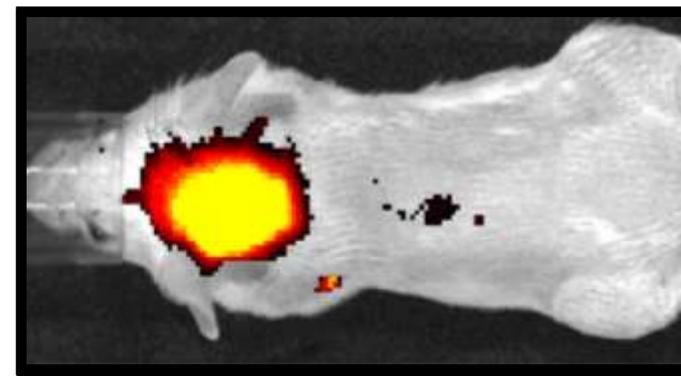
Меченные клетки



Меченные бактерии



Меченные гены



Почему оптический имидж?

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

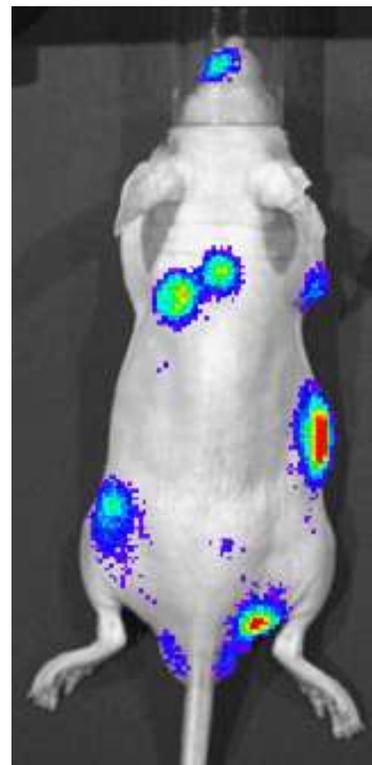
- Свет продуцируется трансгенными животными

Идеально для имиджинга небольших животных

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

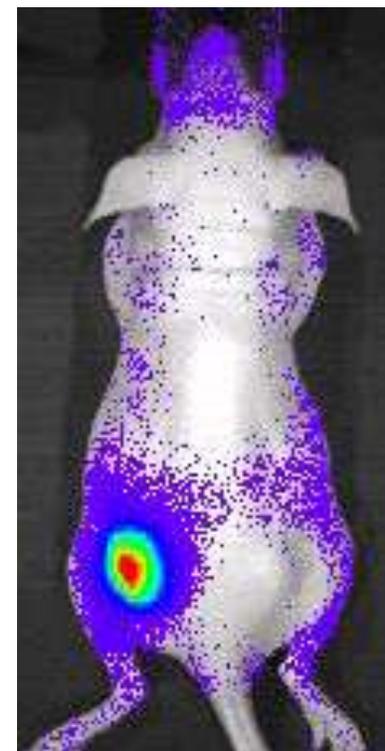
Количественная оценка – испускаемый свет пропорционален количеству меченных клеток

Биолюменесценция



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



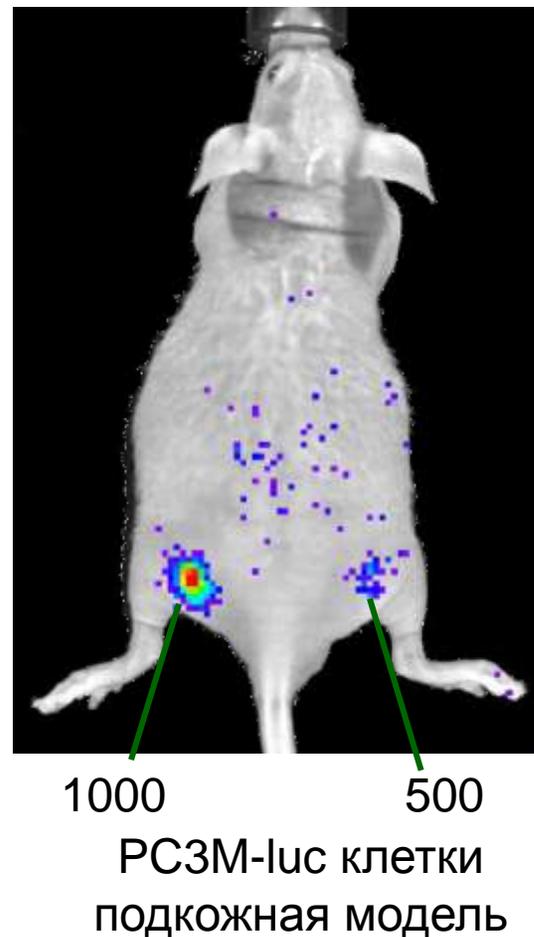
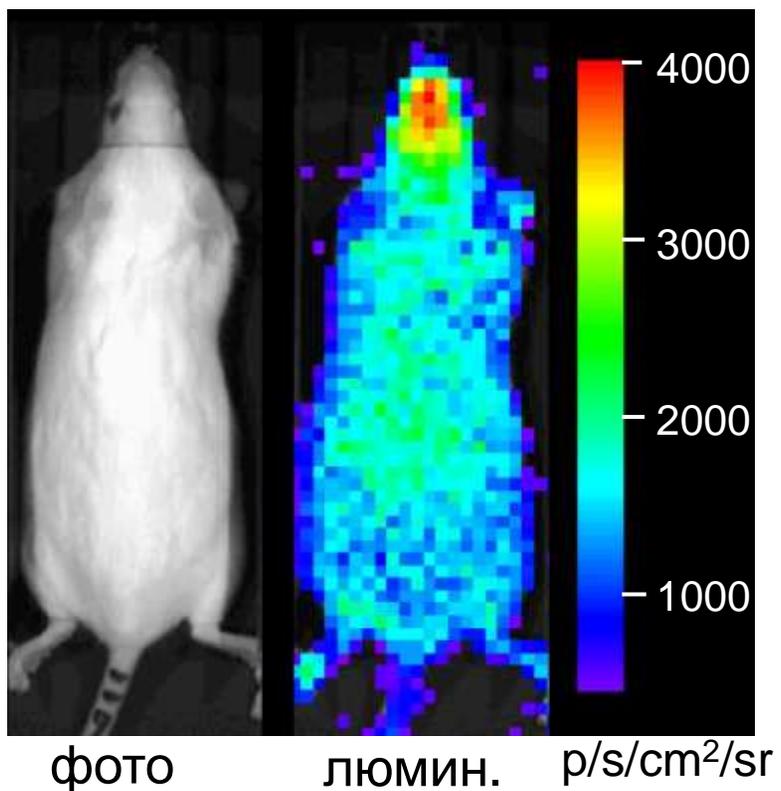
система детекции флуоресценции/биолюминесценции



Биолюминесцентный ИМИДЖИНГ

Чувствительность билюминесцентной детекции

Низкий уровень фона аутолюминесценции в живых моделях

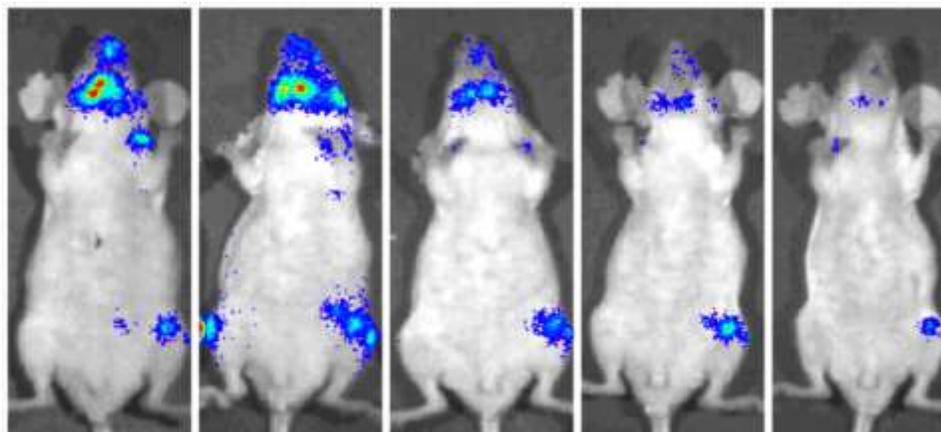


Онкология: Экспериментальная метастатическая модель

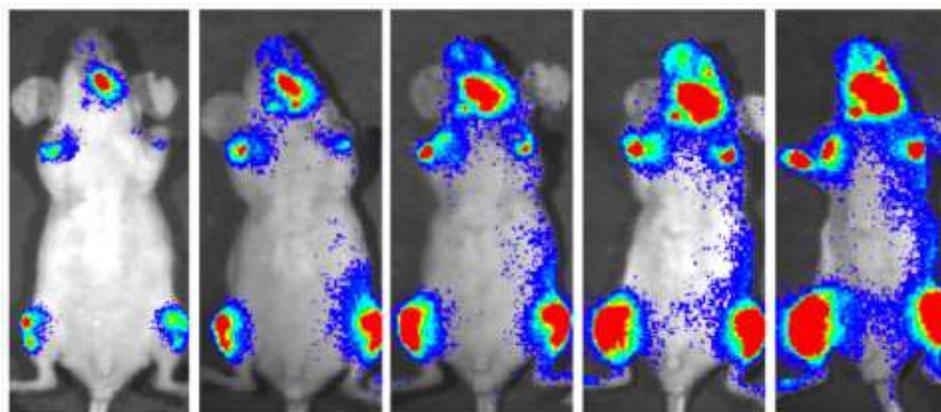
РС-3М-luc (3x10⁶ клеток, интракардиальное введение)

день 20 день 23 день 27 день 30 день 34

Paclitaxel
Начало на 20 день



Placebo



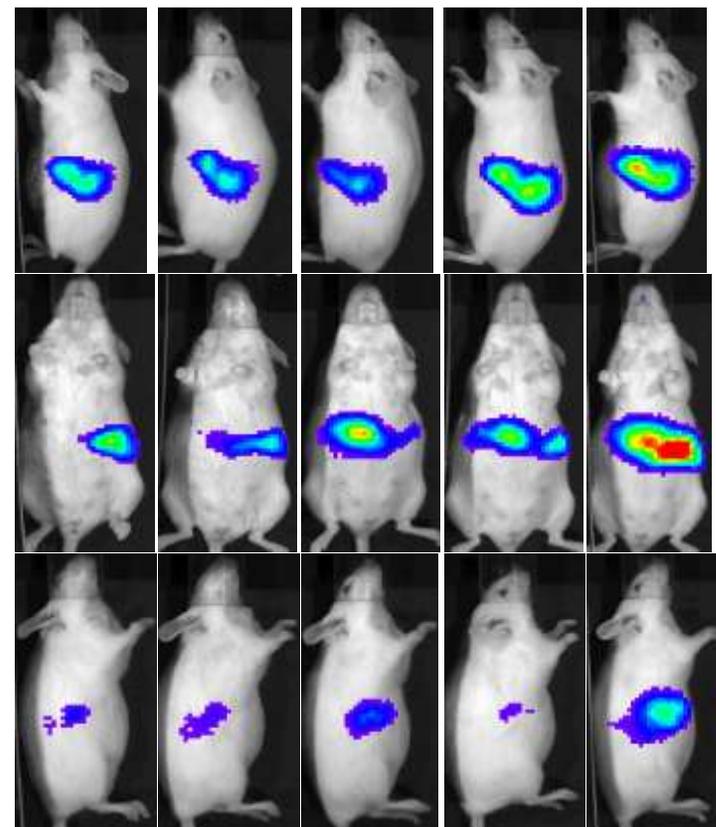
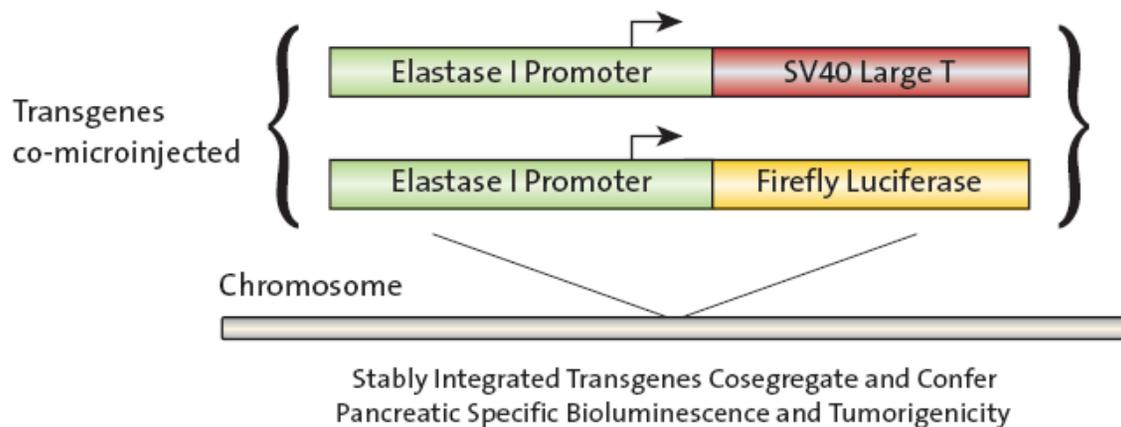
Источник: Корпорация Novartis
Институт для биохимических исследований / Xenogen Corporation

Трансгенные животные:

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

Эластаза I обеспечивает трансгенную экспрессию в Асинар клетках поджелудочной железы

человеческая
панкреатическая аденокарцинома

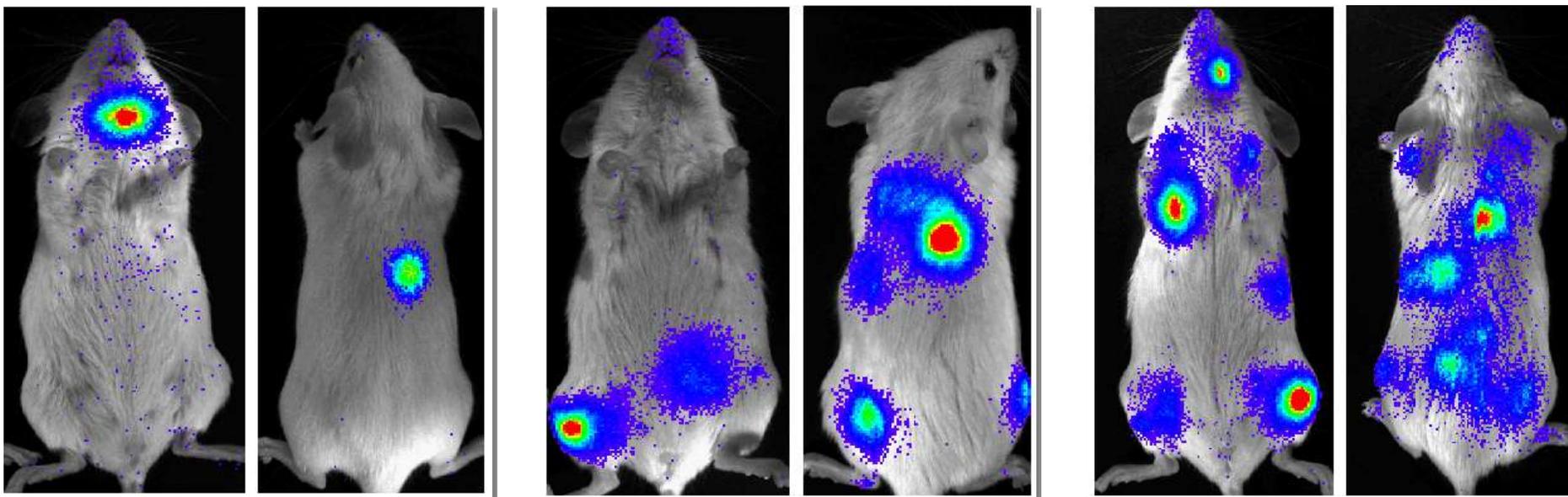


6 weeks 7 weeks 8 weeks 9 weeks 10 weeks

Трансгенные животные: адаптивный трансфер

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

Привитые фракции HSC (гемопозитические стволовые клетки)



10 HSC

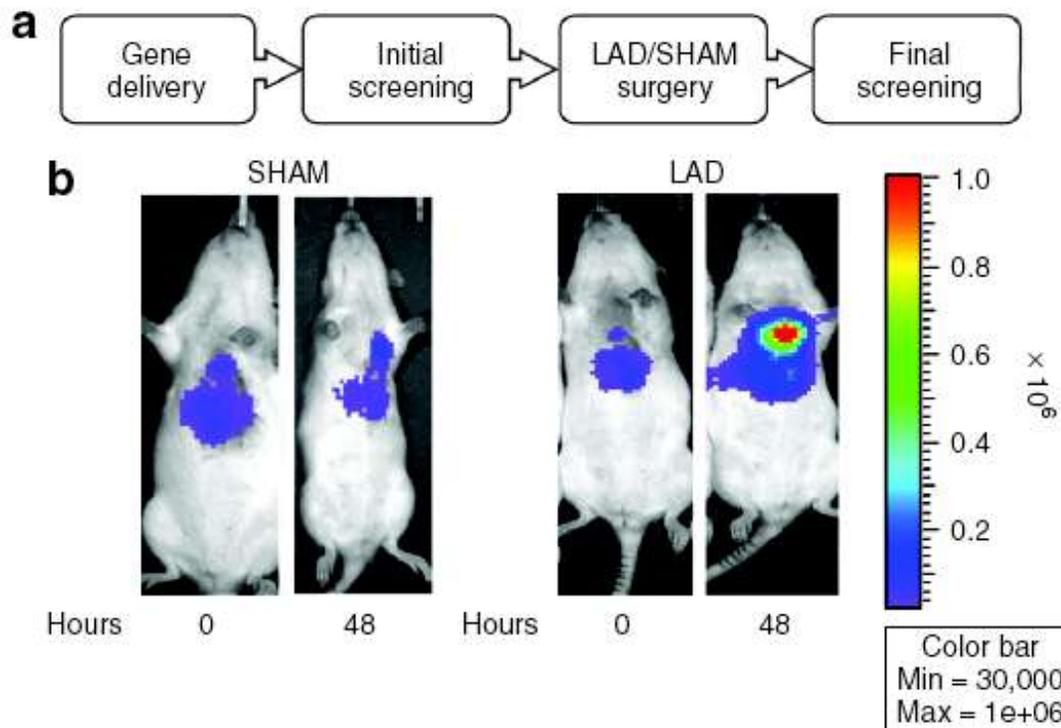
50 HSC

250 HSC

Cao *et al*, 2004

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

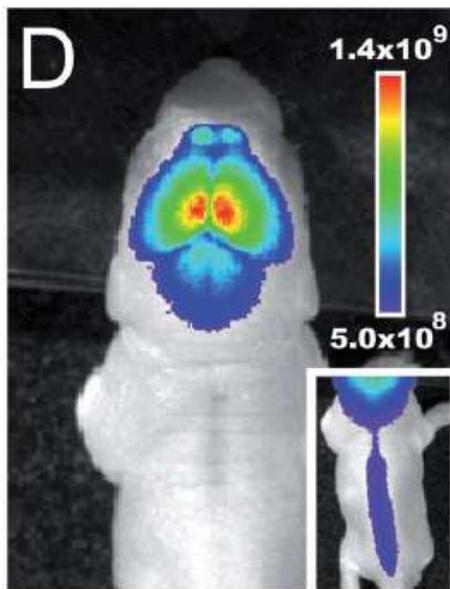
Уникальная вектор-основанная система, регулирующая гипоксию с двойными кислород-чувствительными транскрипционными элементами, была разработана для быстрой и надежной гипоксия-регулируемой экспрессии генов в сердце



Formicheva *et al*, Molecular Therapy, 2008

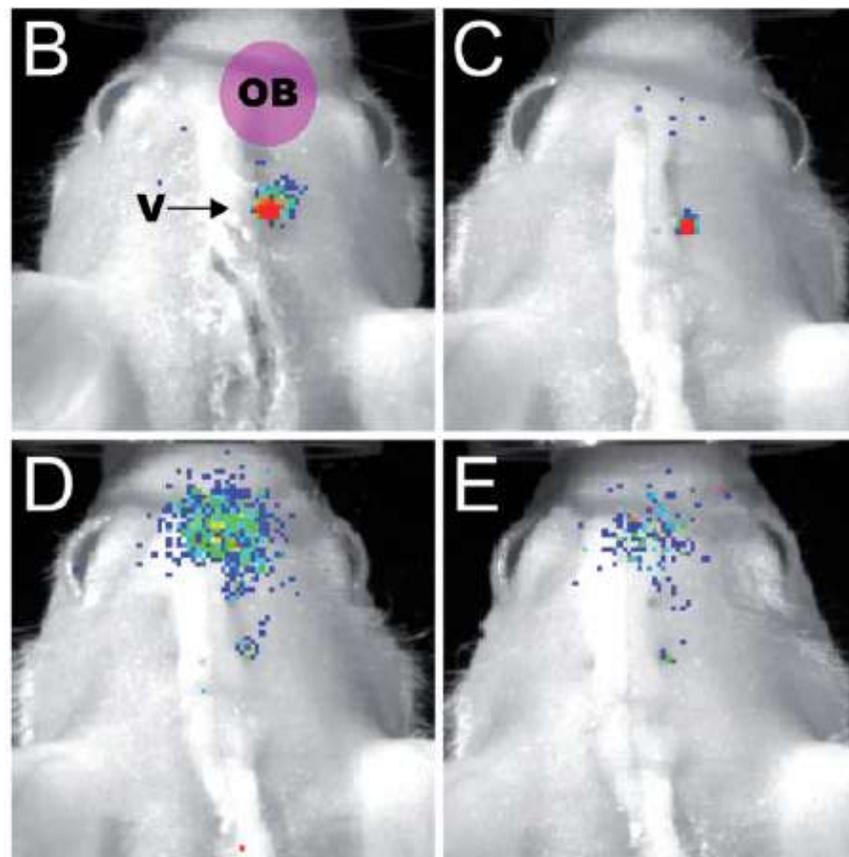
Нейрология: Оптический имиджинг при нейрогенезе

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



Однодневная опухоль DCX-промолюцеферазная мышь

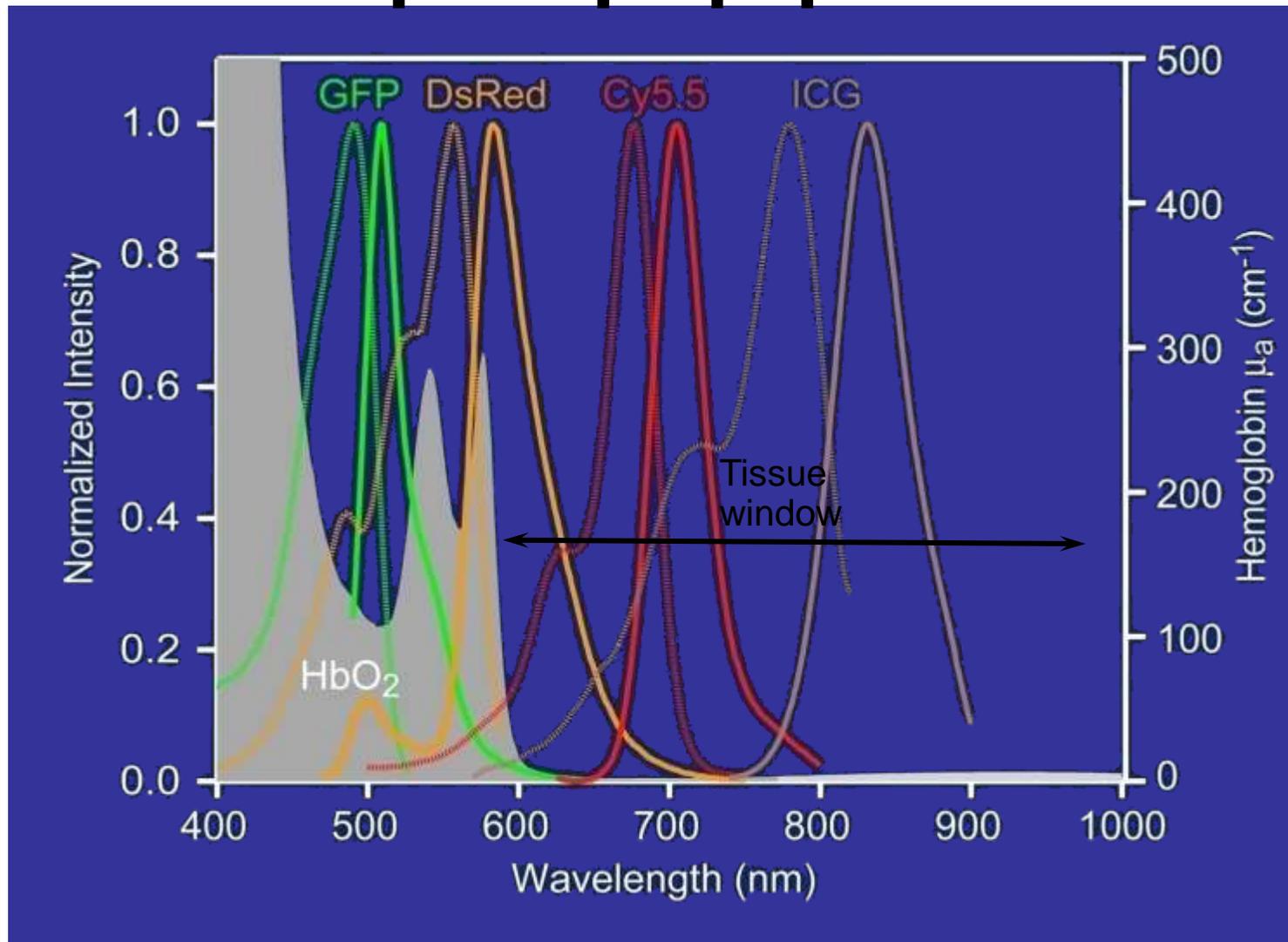
Couillard-Despres *et al.* 2008



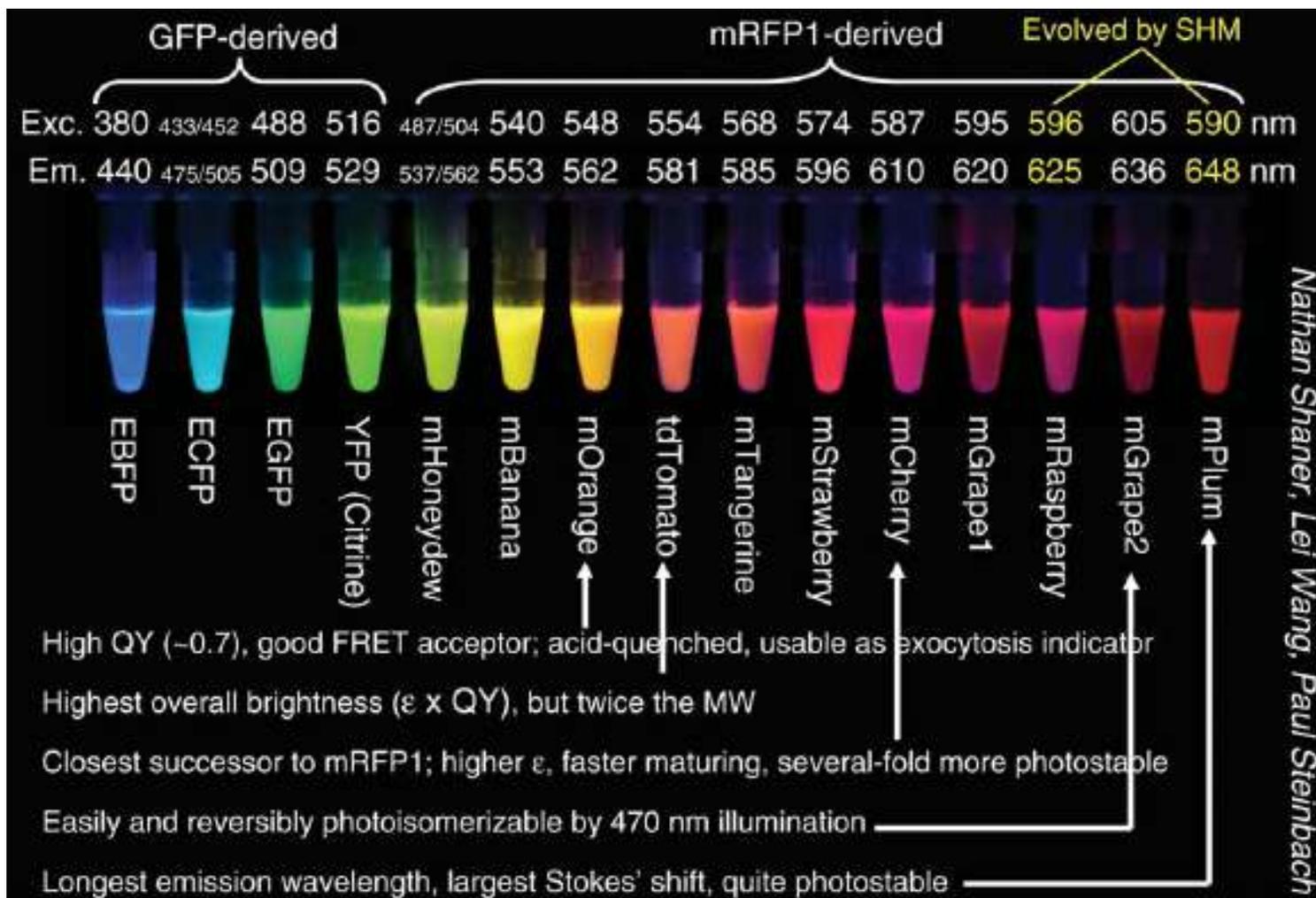
10^5 нейронных клеток- предшественников были введены в правый желудочек сердца NMRI Nu/Nu мыши. Наблюдаемое перераспределение: (B) 6 дней, (C) 8 дней, (D) 10 дней, и (E) 12 дней после трансплантации клеток

Флюоресцентный Имиджинг

Флюоресцентный спектр общеизвестных флюорофоров



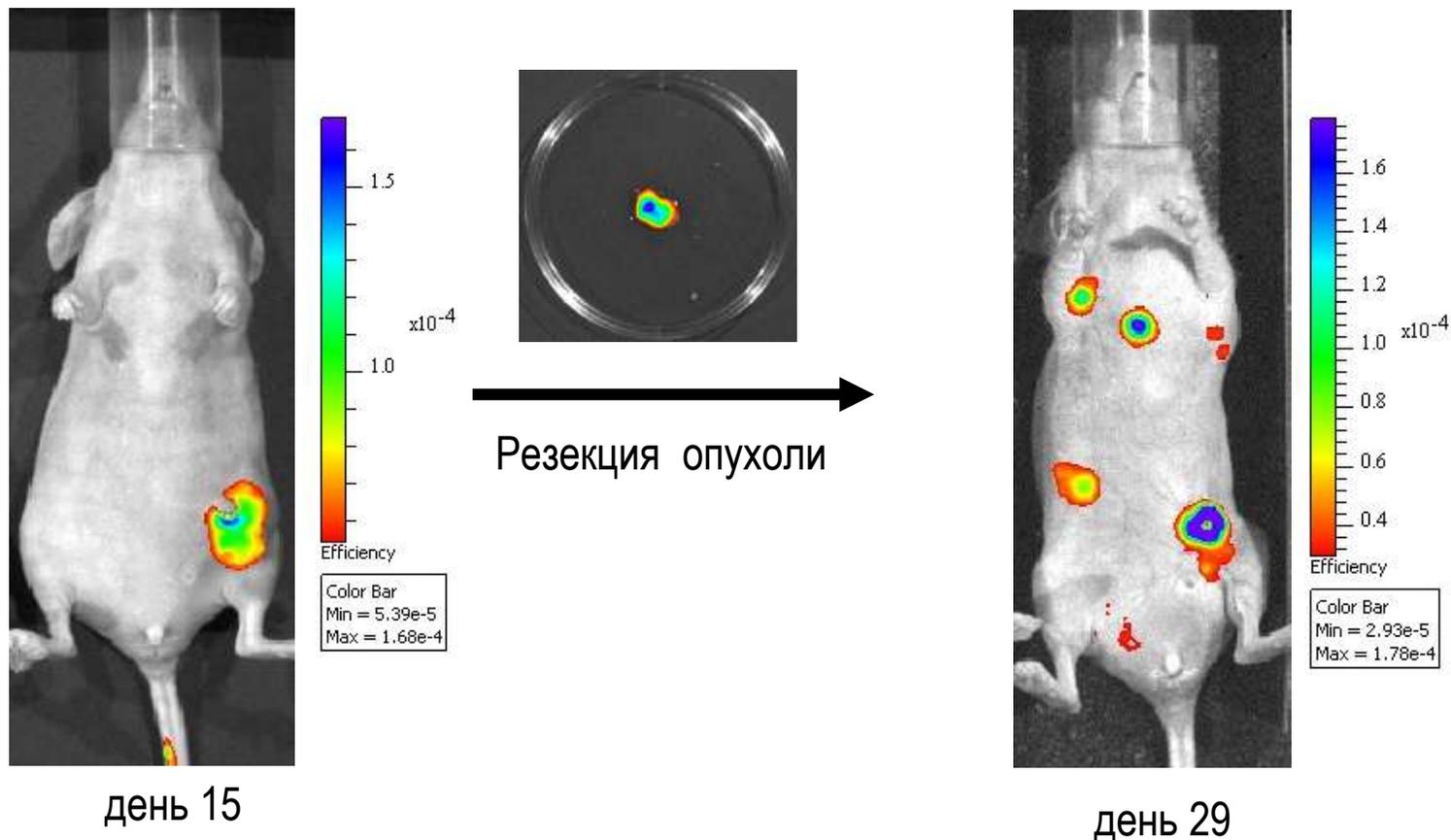
Палитра используемых флюоресцентных белков



Roger Tsien 2005

Bioware Ультра *красный*

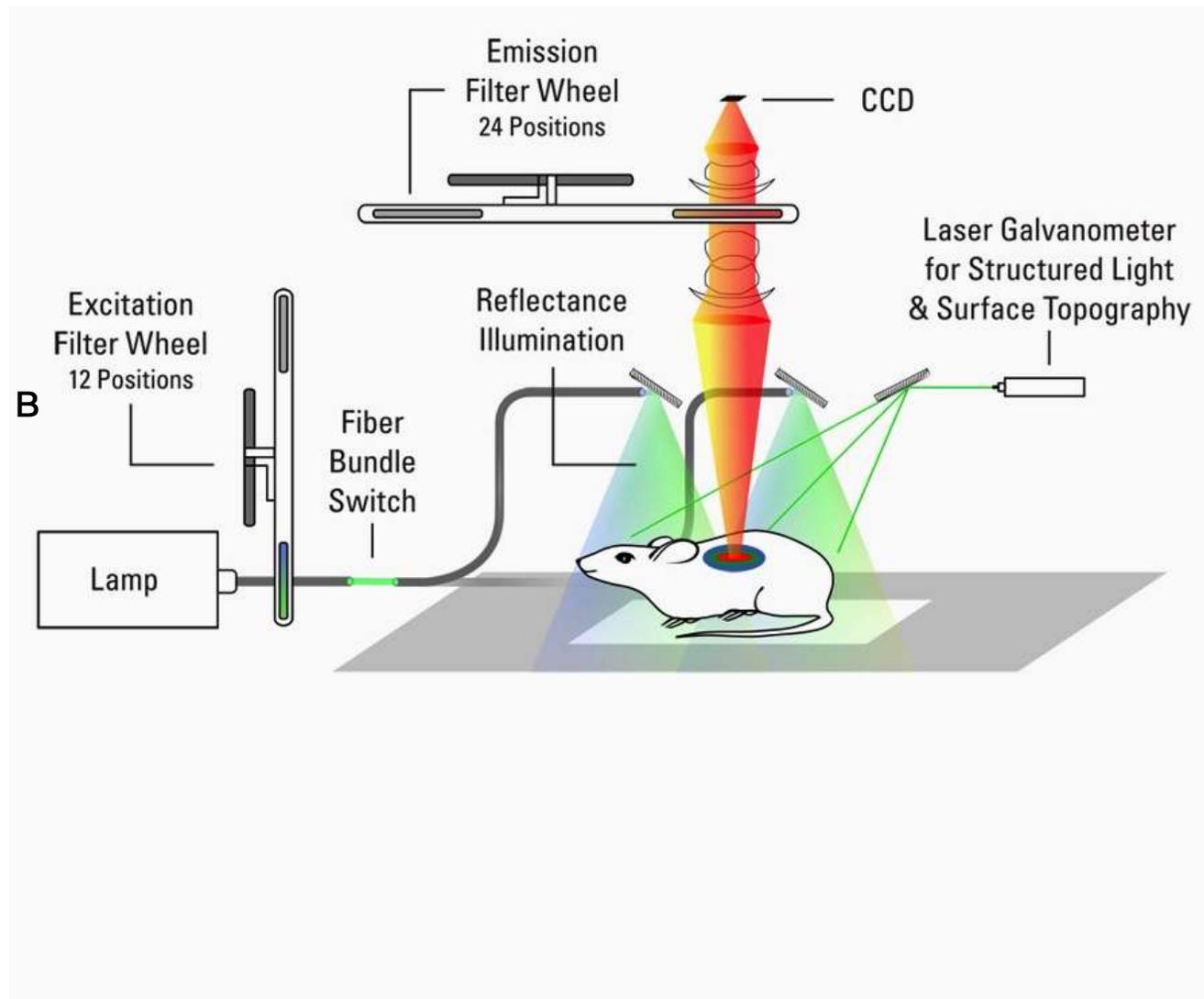
Рост ортотопической опухоли (клеточная линия 4T1-tdTomato)



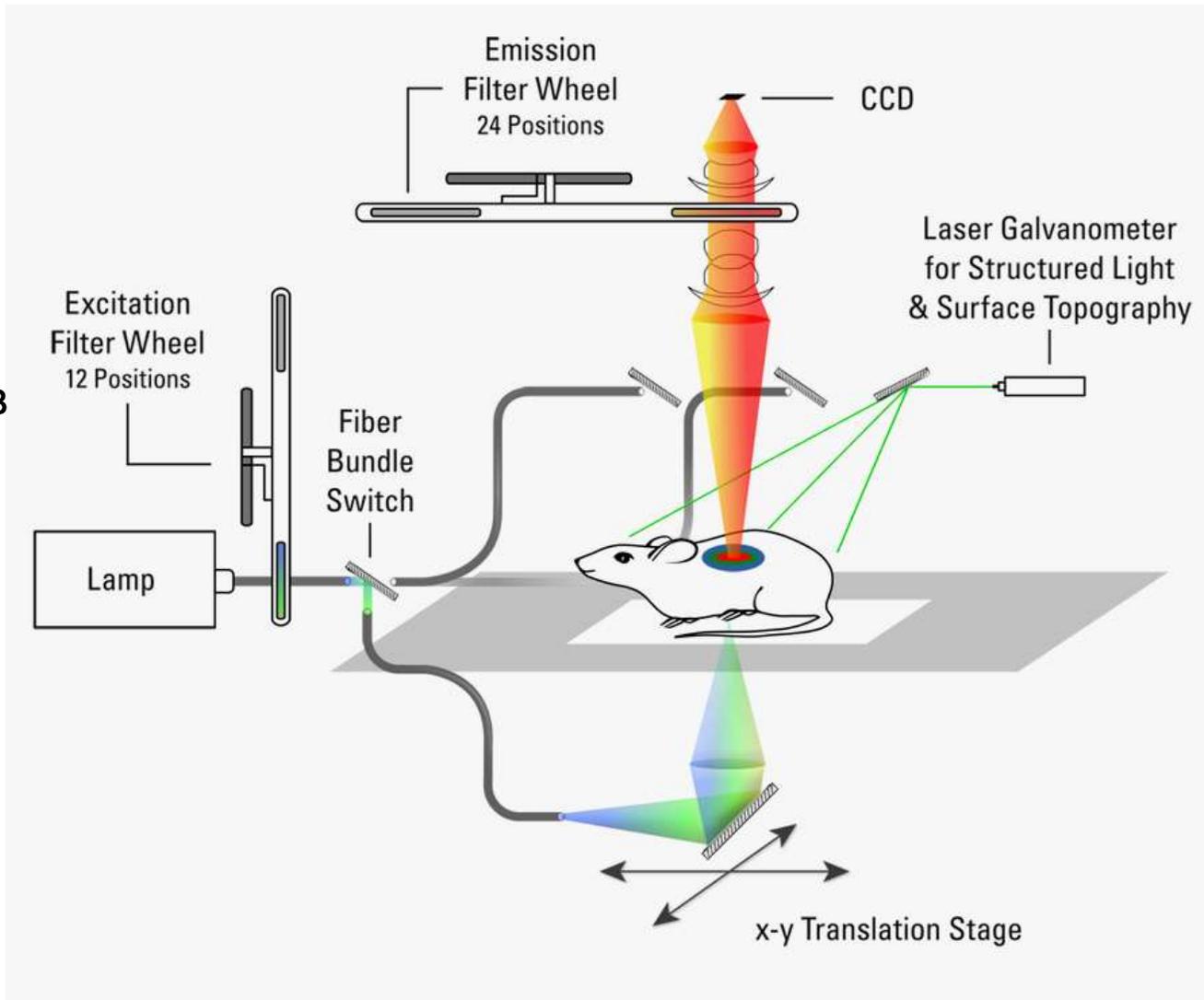
Изучение процесса образования множества метастазов после резекции первичной опухоли

IVIS Spectrum

Режим работы в
отражённом
свете



IVIS Spectrum

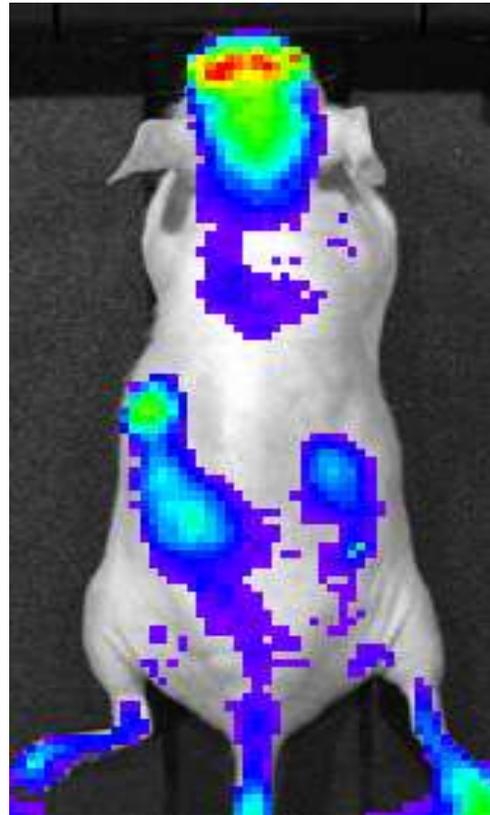


Режим работы в
проходящем
свете
(трансиллюмин
ация)

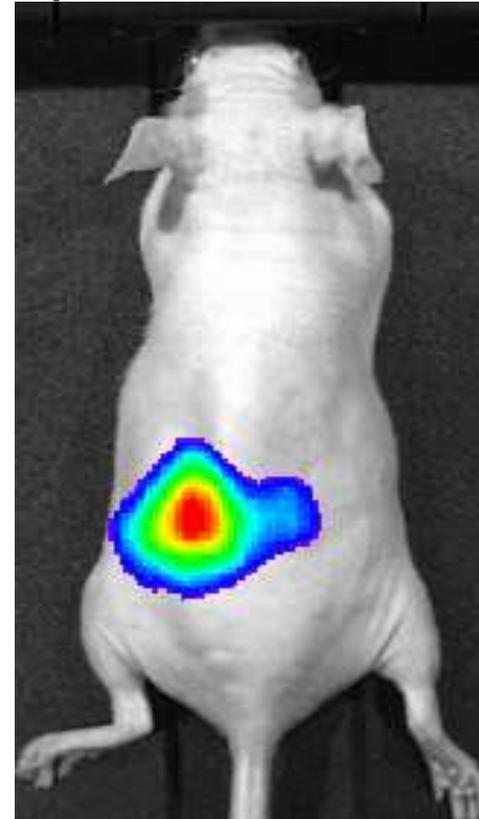
Трансиллюминация AlexaFluor 680

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

Ері-иллюминация Трансиллюминация



sig/ bkg=1.10



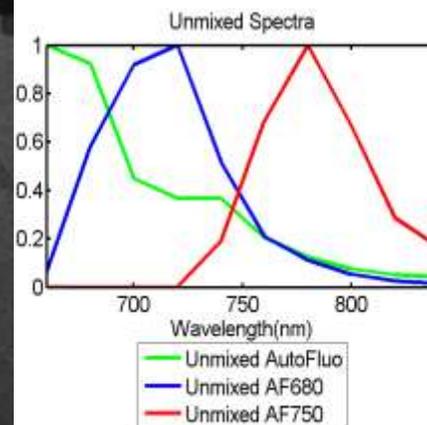
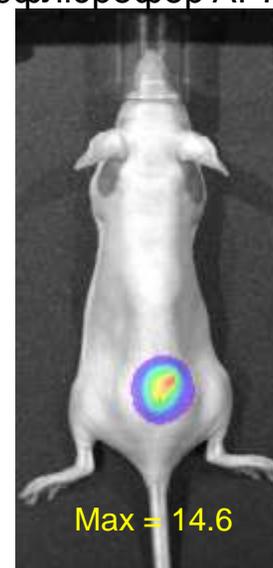
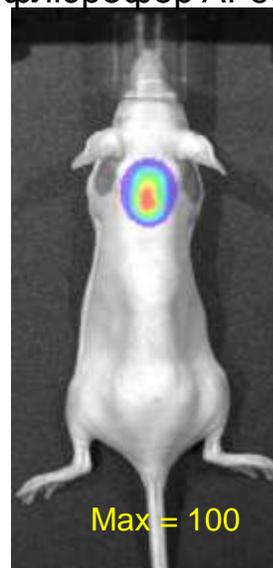
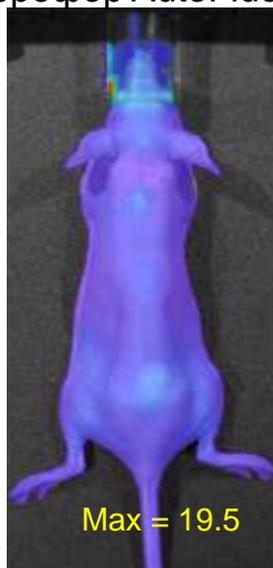
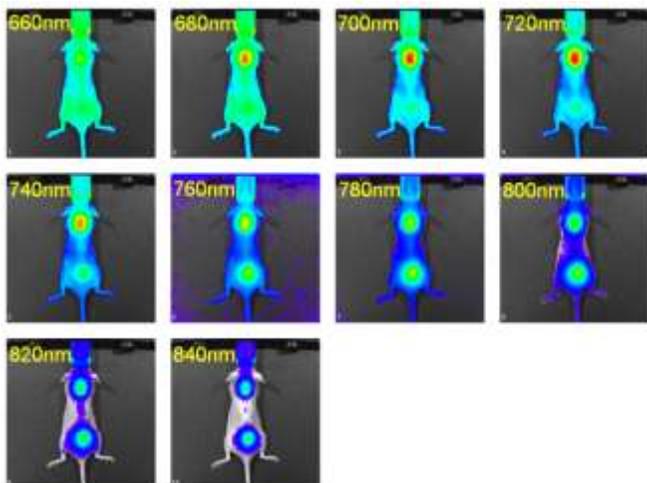
sig/ bkg=1.10

Мультимодальный Имиджинг

Спектральное разделение Alexafluor 680/750

флюорофор AutoFluor флюорофор AF680 флюорофор AF750

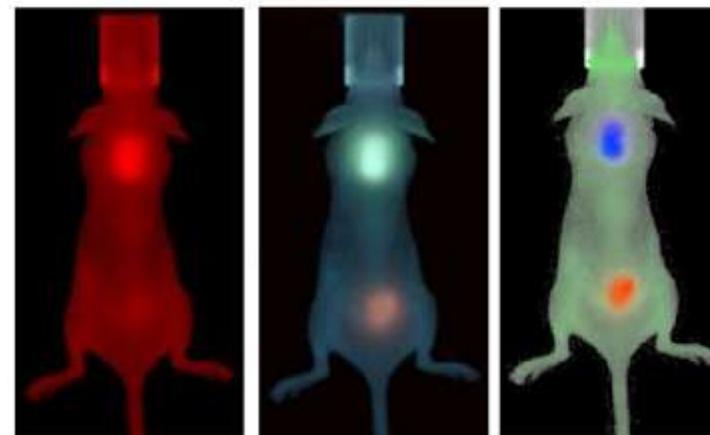
Исходные спектральные данные



Real RGB

Adaptive RGB

Composite



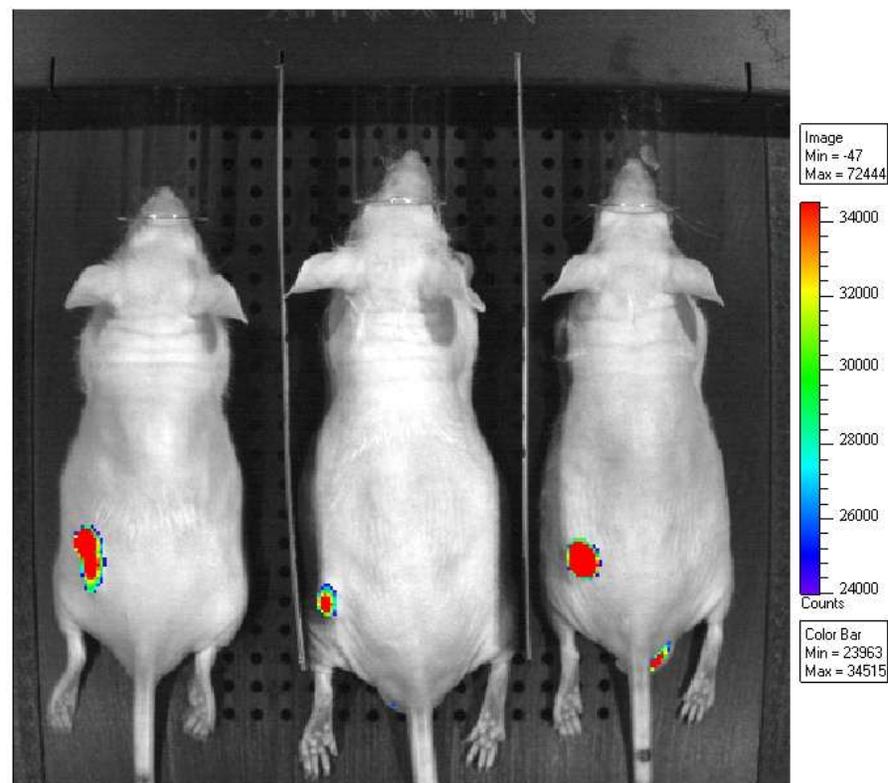
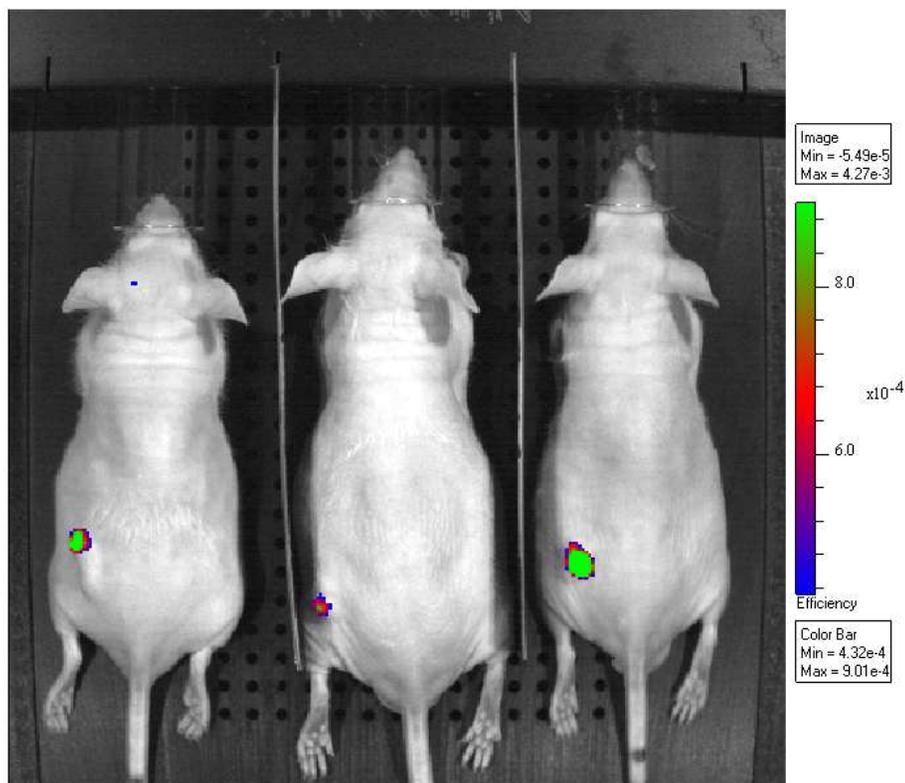
Подкожные инъекции 10^{14}
молекул Alexafluor 680 и
Alexafluor 750

Режим работы в отражённом
свете

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

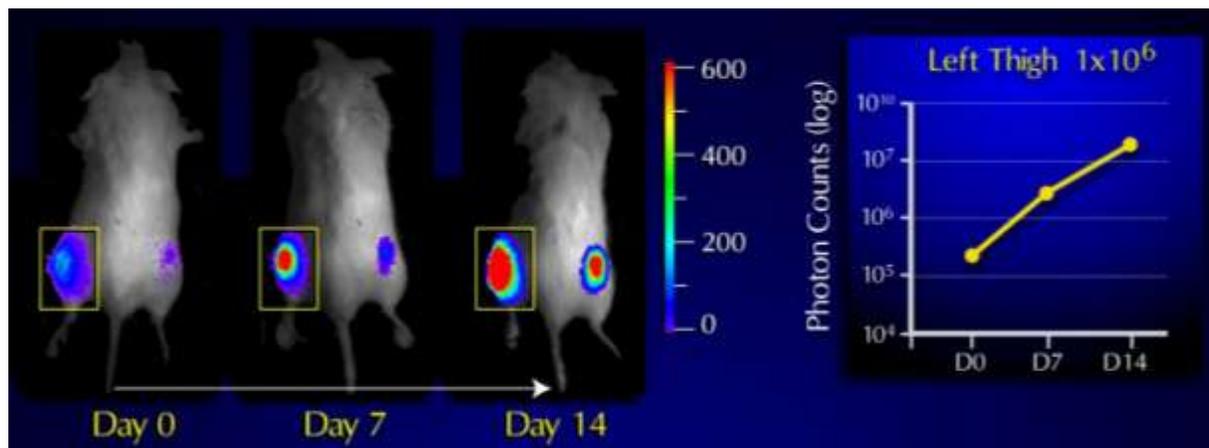
3D-диффузная томография

Мониторинг и контроль

Относительное измерение

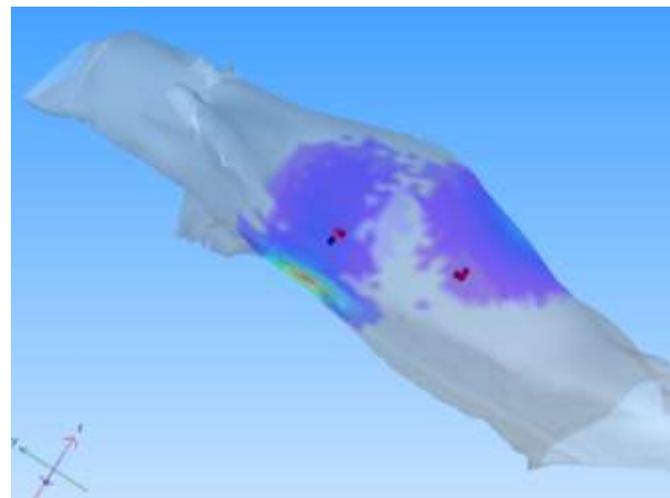
- Нельзя сравнивать опухоли с разной локализацией

PC-3M-luc рост опухоли



3D Томография

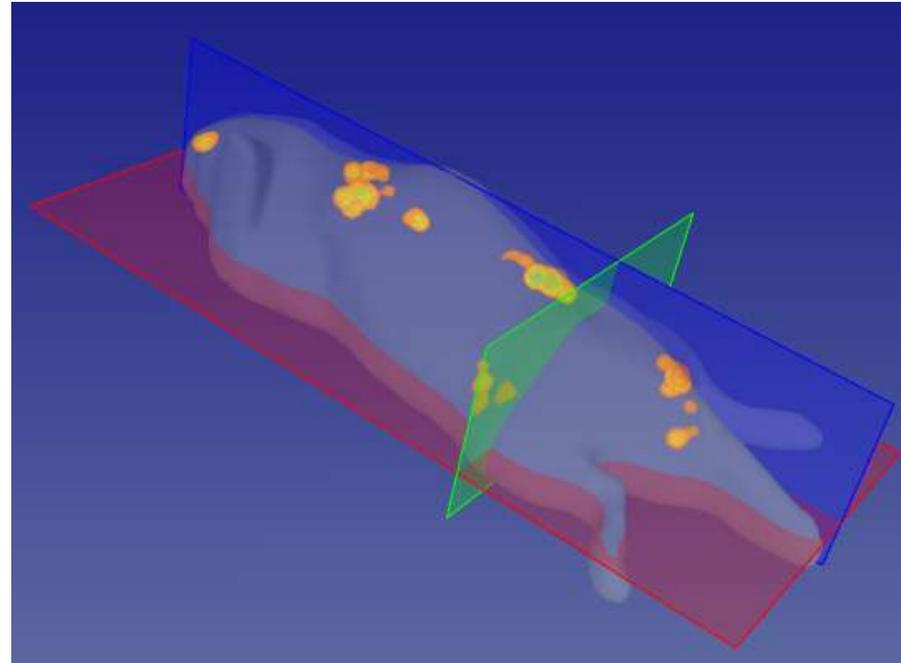
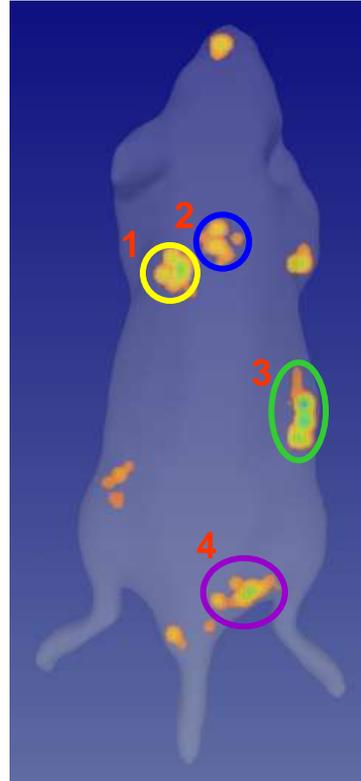
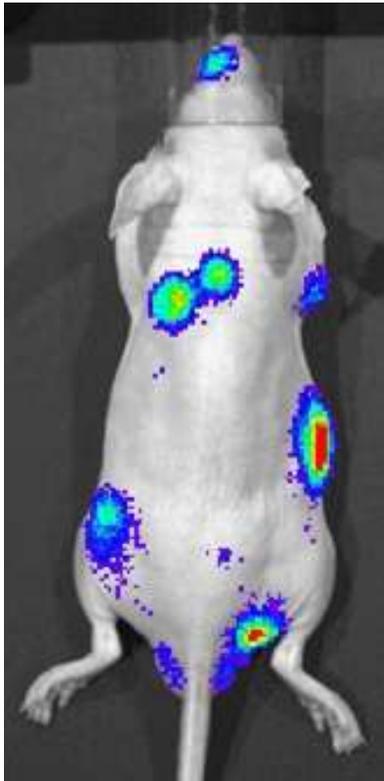
- Возможность получить количественную оценку и выявить 3D локализацию по цветовой интенсивности исследуемого района
- Рассеянная люминесцентно-имиджинговая томография (DLIT™)
- Требуется мульти-множественный вид /спектральные имиджи
- Возможное разрешение ~1-3 мм



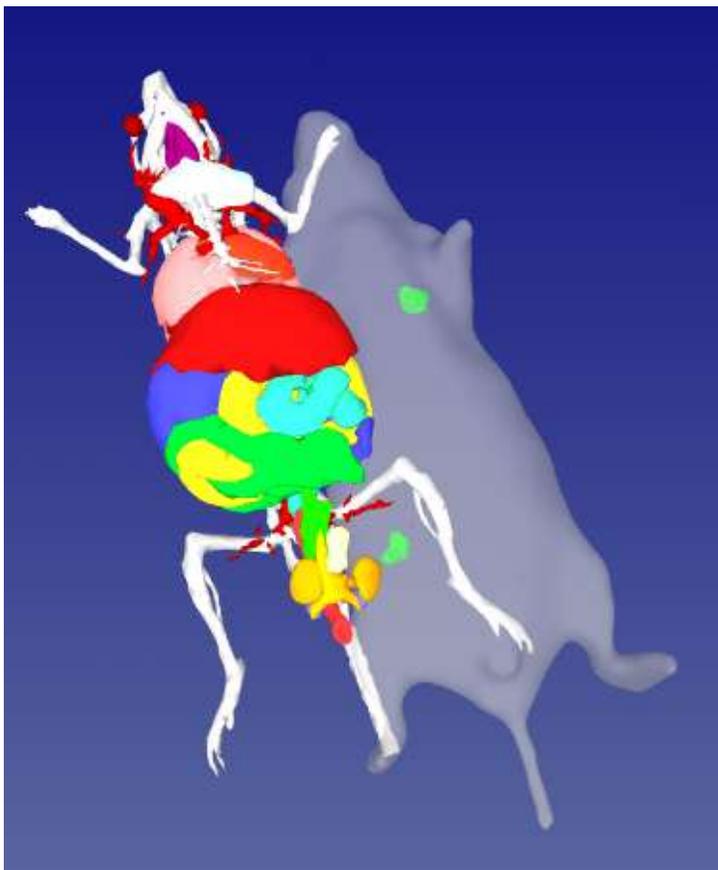
Метастазная модель меланомы B16F10

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

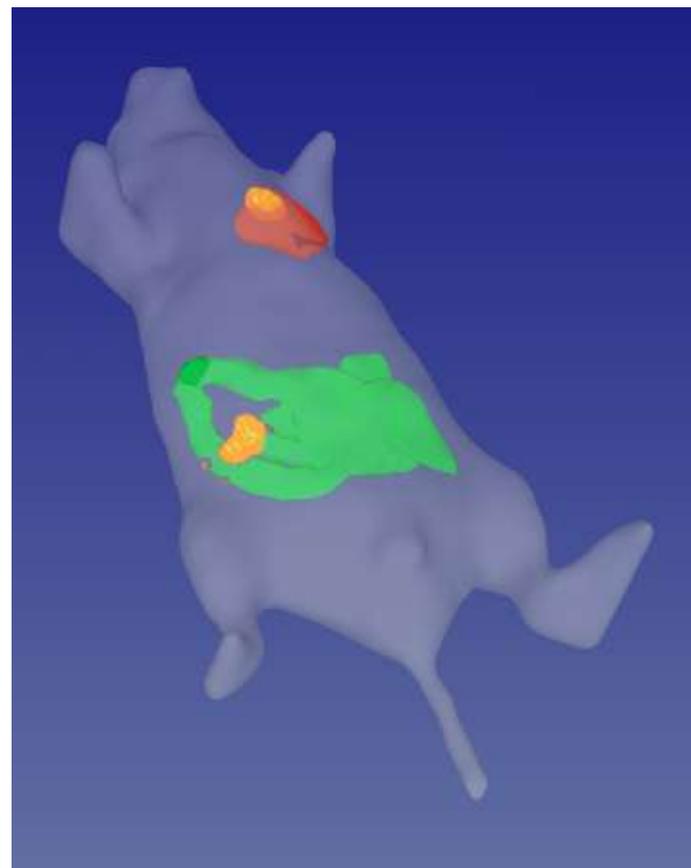
Вид со спины



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



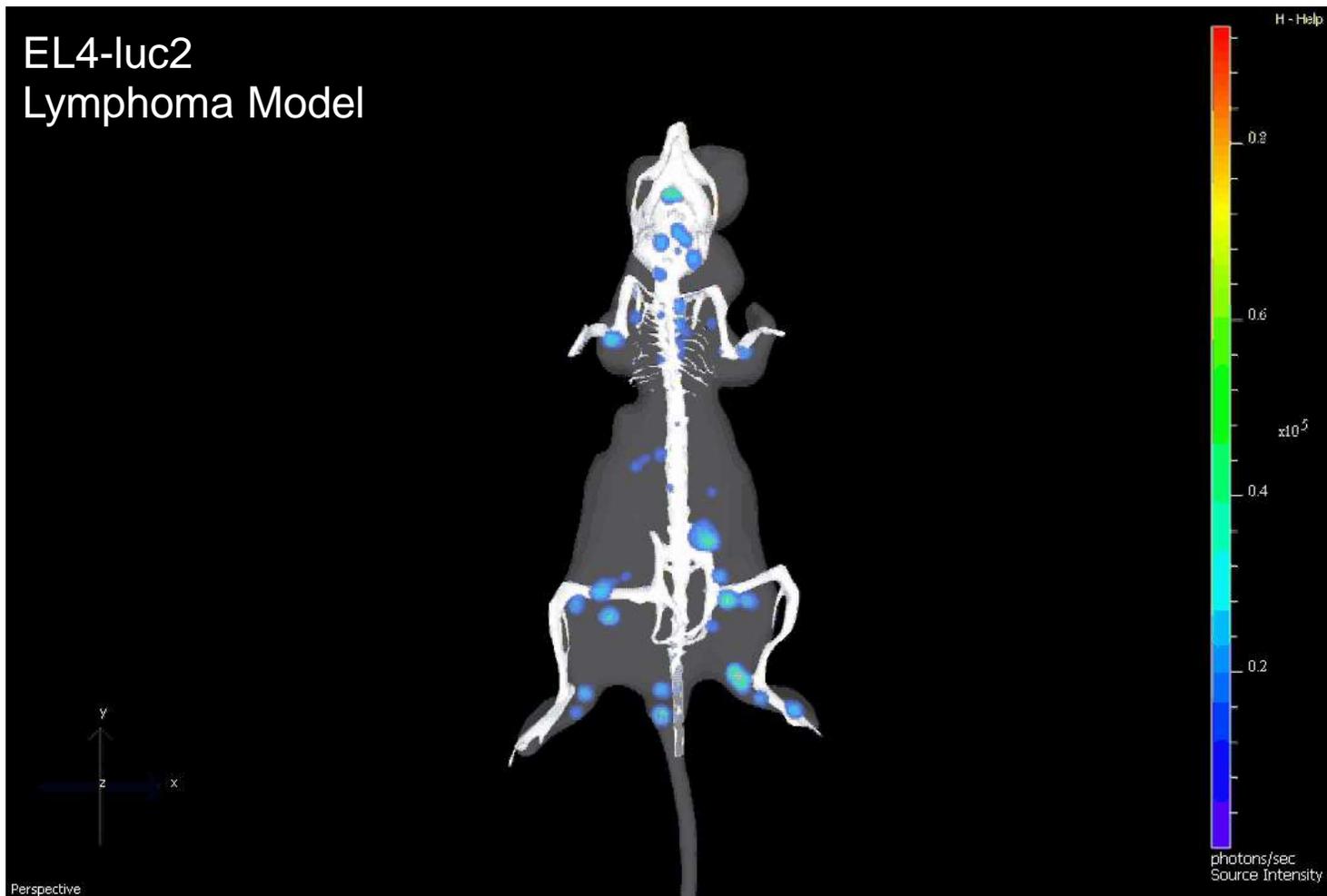
Отдельные изображения

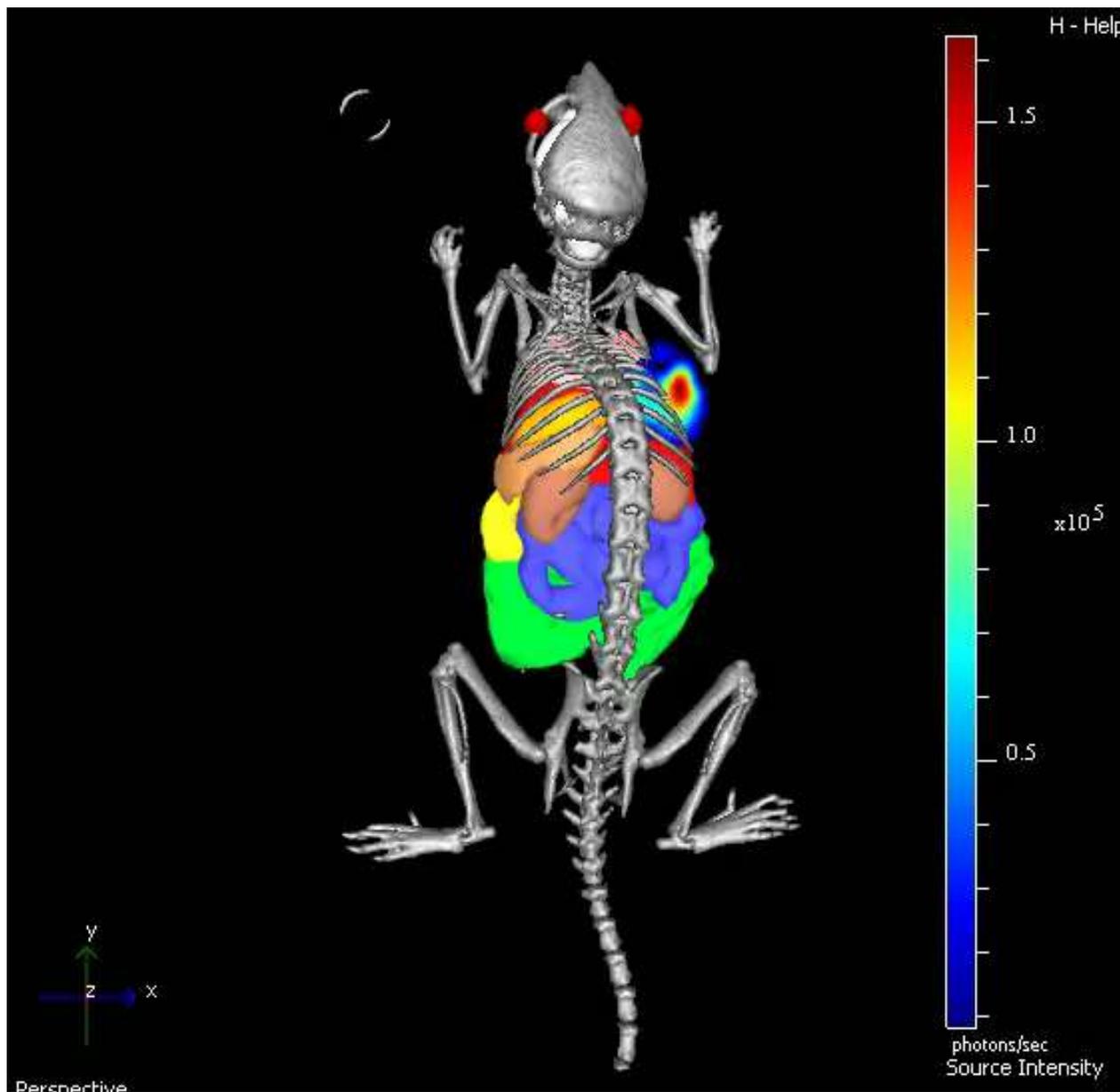


Наложение изображений

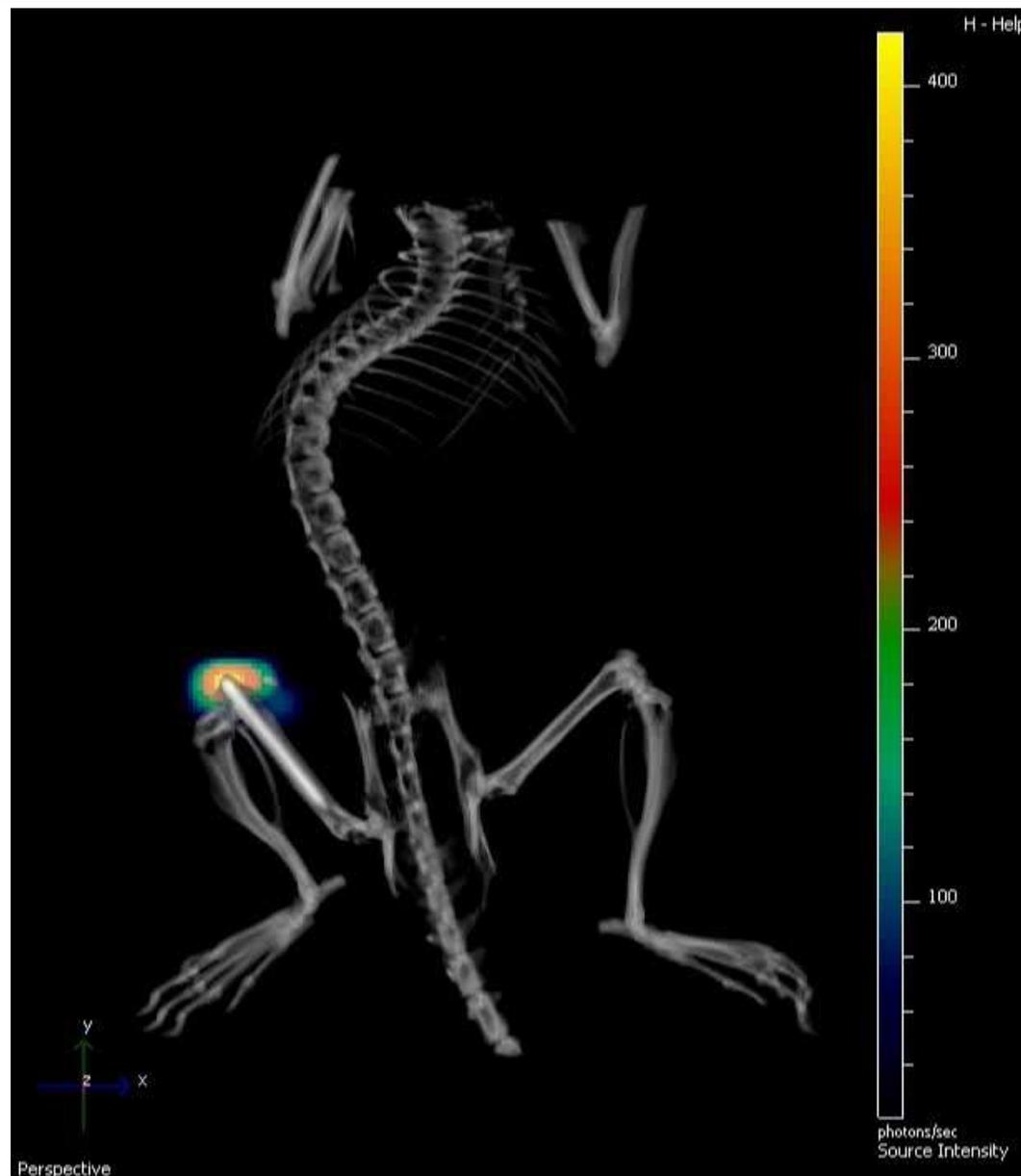
3D Биолюминесценция

Сопоставление изображения экспериментальной мыши с анатомическим атласом





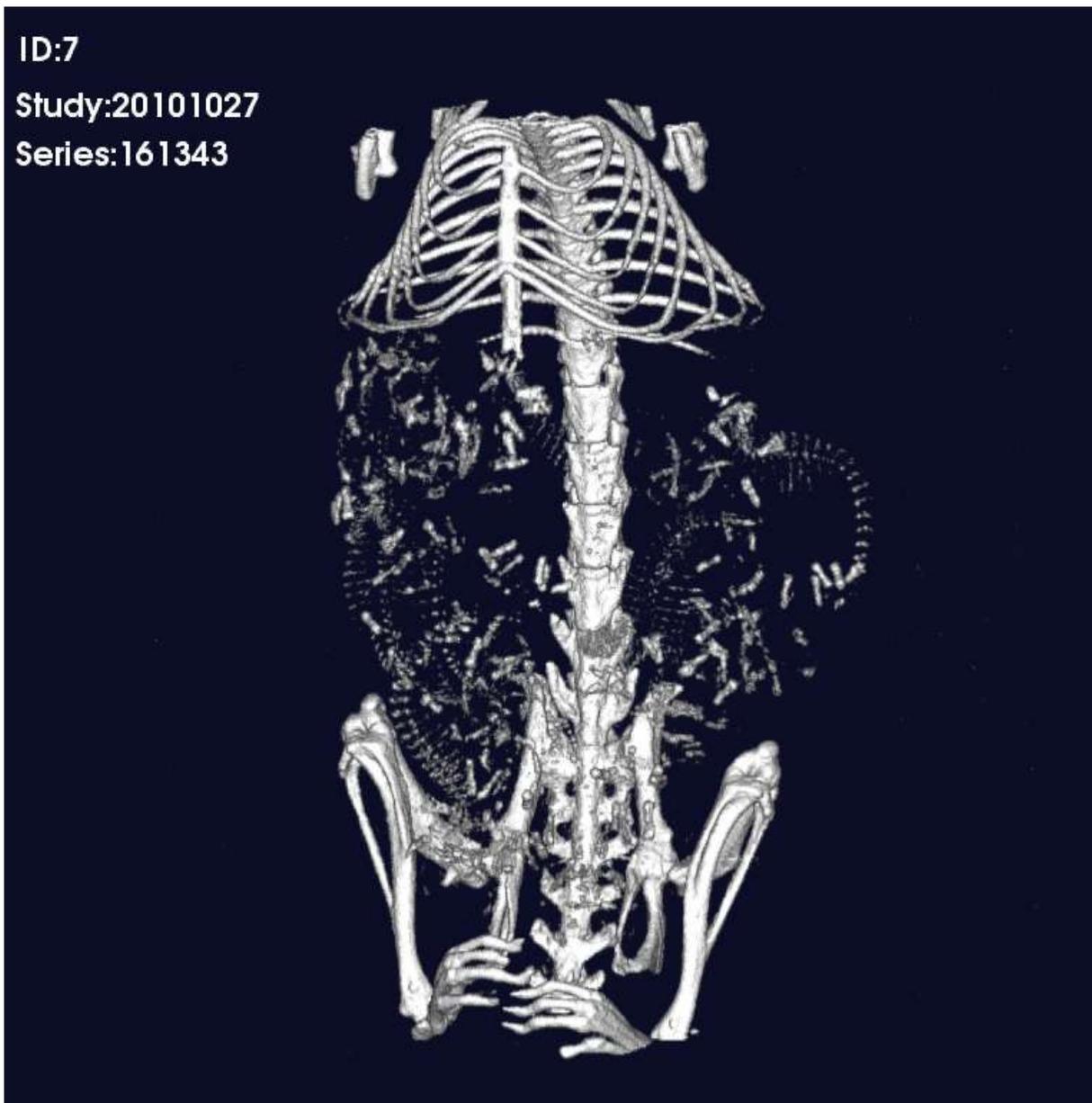




ID:7

Study:20101027

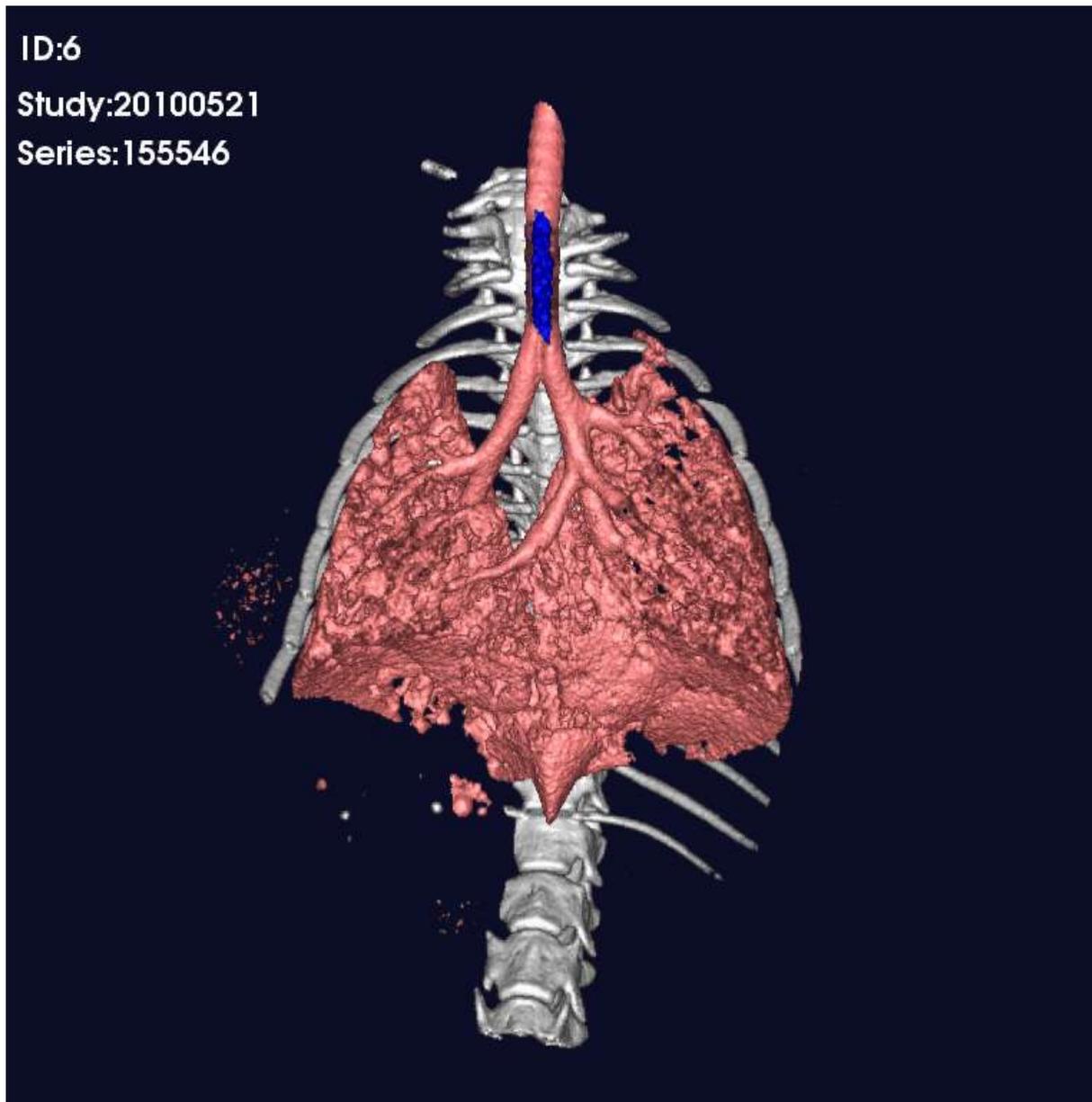
Series:161343



ID:6

Study:20100521

Series:155546





Официальный представитель компании Caliper a PerkinElmer Inc.

«ЗАО Приборы - Pribori Oy»

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

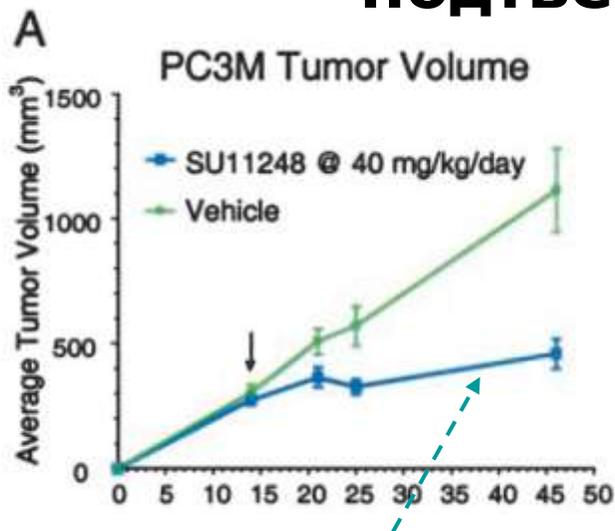
Тел. (495) 937-45-94

факс (495) 937-45-92

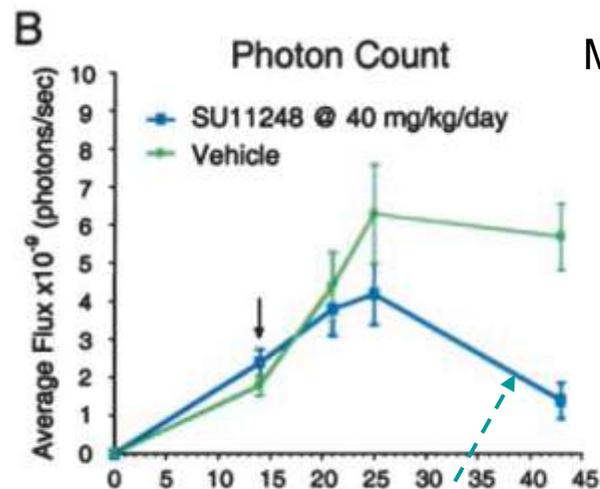
www.pribori.com



Фармакология: данная технология получила подтверждение FDA

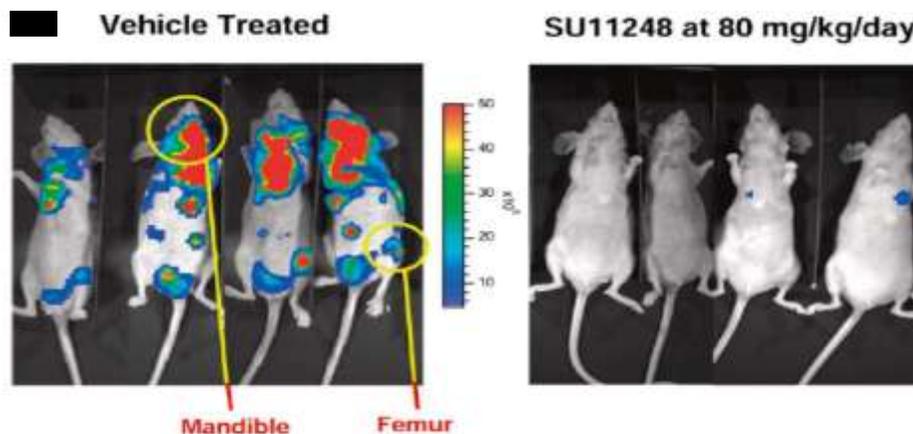


Физическое измерение
(опухоль все еще становится больше)



Mendel *et al* 2003

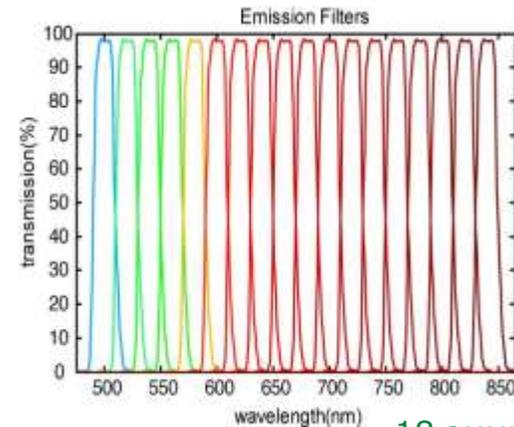
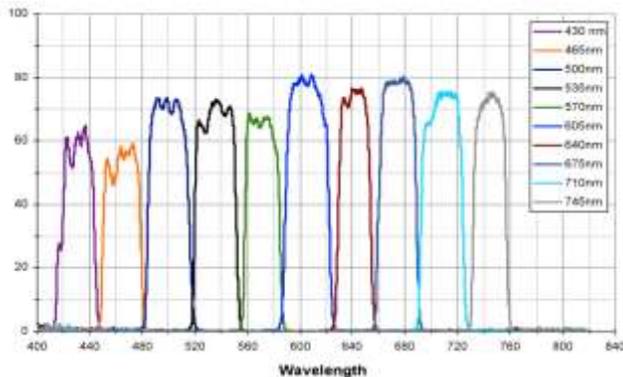
Биофотонный имиджинг
(опухолевые клетки уже убиты)



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



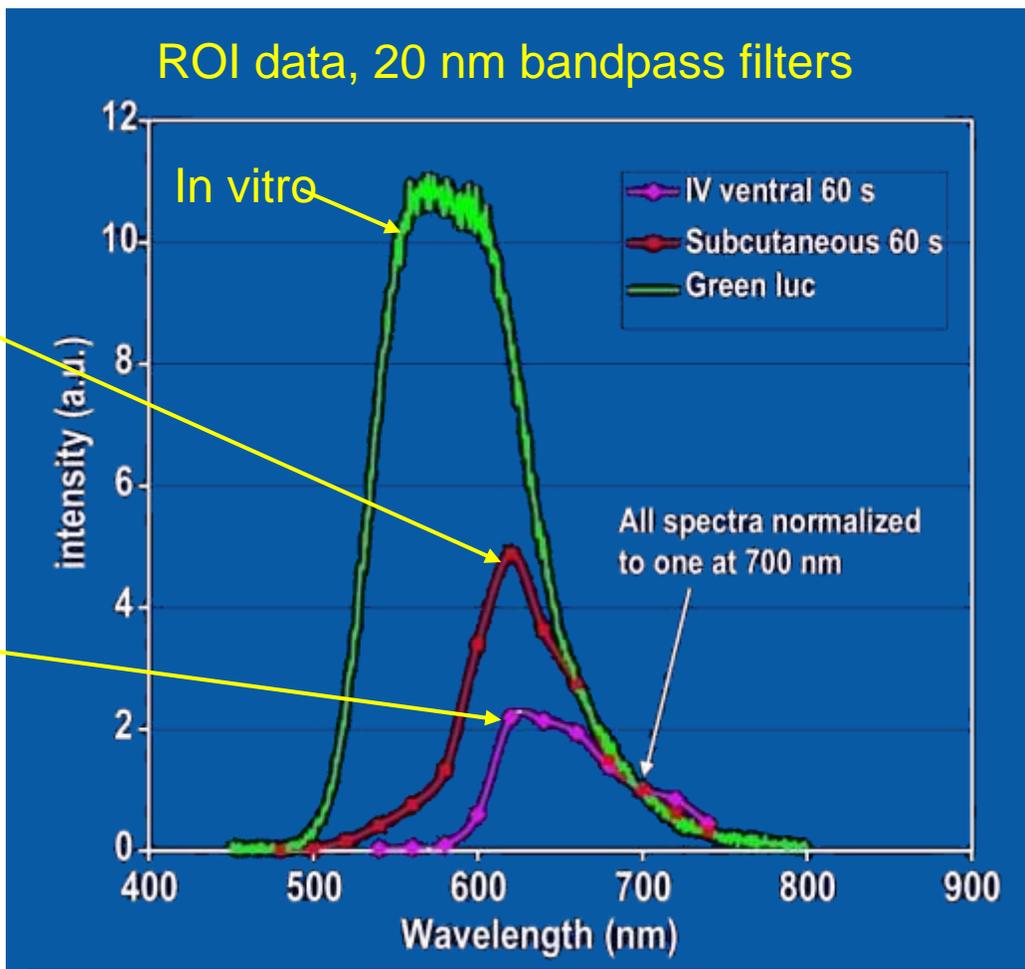
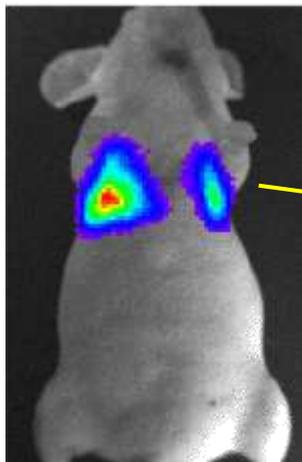
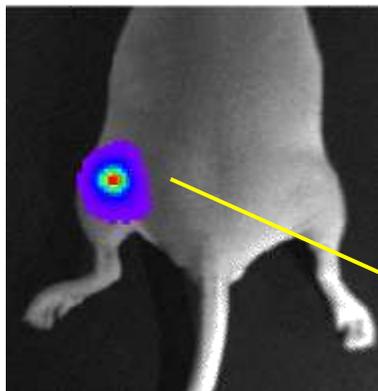
10 фильтров возбуждения

18 эмиссионных фильтров

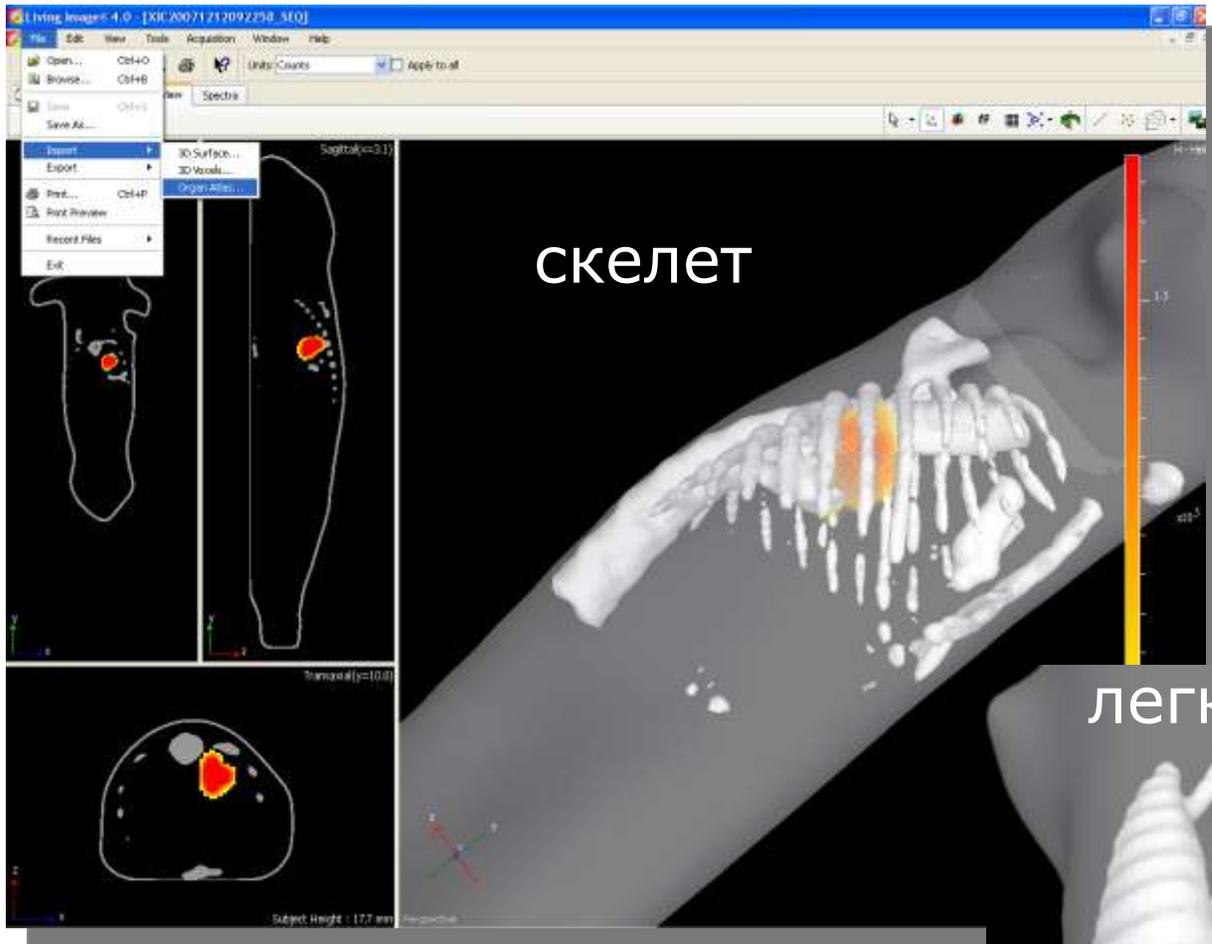


- $1e^{-8}$ OD блокирующие фильтры
- 95% пропускания
- Фильтры вставлены в жесткую конструкцию (колесо) для получения лучших результатов и обеспечения более высокой прочности конструкции

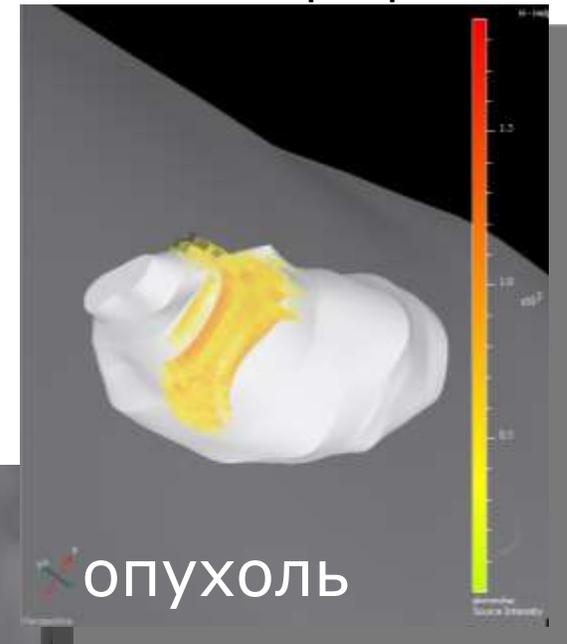
Спектральные измерения позволяют получить информацию о глубине нахождения источника свечения в животном



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