

**INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ
im. Henryka Niewodniczańskiego
Polskiej Akademii Nauk
ul. Radzikowskiego 152, 31-342 Kraków**

www.ifj.edu.pl/publ/reports/2011/

Kraków, grudzień 2011

Raport Nr 2053/AP

**Linia eksperymentalna do napromieniania pojedynczych żywych
komórek przy stanowisku mikrowiązki rentgenowskiej w IFJ PAN
Opis techniczny**

S.Bożek^{1,2}, J.Bielecki^{1,3}, Z.Stachura¹, J.Lekki¹, M.Sienkiewicz¹, J.Świerblewski¹,
T.Pieprzyca¹, Z.Szklarz¹, E.Dutkiewicz¹, A.Z.Hrynkiewicz¹, W.M.Kwiatek¹

¹ Instytut Fizyki Jądrowej Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

² Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Collegium Medicum

³ Narodowe Centrum Badań Jądrowych, Centrum Informatyczne w Świerku

Praca finansowana ze środków MNiSW, grant nr NN 518 295 540

Abstract

X-ray experimental microbeam line for single live cells irradiation has been constructed at the Institute of Nuclear Physics PAN. The facility is based on an open type X-ray tube with microfocusing (the X-ray emission spot size is about 2 micrometers in diameter) and anode exchange ability. In the microdosimetry experiment a Titanium anode with the 4.5 keV energy of K_{α} characteristic radiation line is used. The X-ray radiation, emitted from the spot into a cone of 120 degrees angle, is focused on the sample using the X-ray focusing multilayer mirrors in the Montel geometry. The focusing distance is 32 mm, and the focal spot is about 20 micrometers in diameter. The beam image can be observed using the X-ray sensitive CCD camera, as well as with the use of an optical microscope and the P43 scintillator screen. Cells are seeded on a thin mylar foil, which is mounted on a drilled opening in the bottom of the Petri dish. After visual selection of cells dedicated to irradiate, and setting of experimental parameters, the irradiation process is carried out automatically, and cells are irradiated with a controlled X-ray dose.

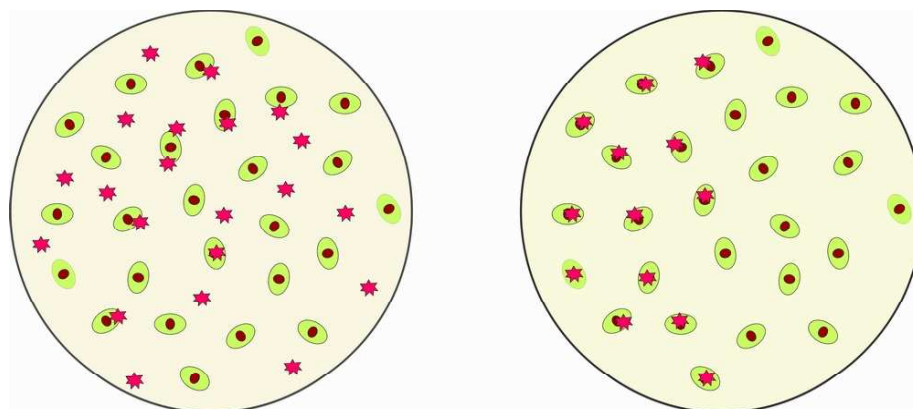
Streszczenie

W Instytucie Fizyki Jądrowej PAN przy stanowisku mikrowiązki rentgenowskiej skonstruowana została linia eksperymentalna do napromieniania pojedynczych żywych komórek promieniowaniem X. Układ działa w oparciu o lampę rentgenowską typu otwartego z mikroogniskowaniem oraz możliwością wymiany anod. W tym eksperymencie wykorzystywana jest anoda tytanowa, emitująca promieniowanie charakterystyczne linii K_{α} o energii 4.5 keV. Wiązka polichromatycznego promieniowania X emitowana jest z powierzchni o średnicy ok. 2 mikrometrów w stożek o kącie rozwarcia 120° . Ogniskowanie rozbieżnej wiązki odbywa się przy użyciu zwierciadeł wielowarstwowych w geometrii Montela, zatem układ ogniskujący jest równocześnie monochromatorem dostosowanym do energii linii K_{α} tytanu. Odległość ogniskowania wynosi 32 mm, a zogniskowana wiązka w przekroju ma średnicę ok. 20 mikrometrów. Obraz wiązki może być obserwowany przy użyciu kamery CCD rejestrującej promieniowanie X, jak również przy użyciu układu mikroskopu optycznego i scyntylatora P43. Komórki wysiewane są na cienkiej folii mylarowej, zakrywającej kilkumilimetrowy otwór wywiercony w szalce Petriego, a następnie napromienianie ściśle określoną dawką promieniowania. Po zaznaczeniu widocznych na zdjęciu próbki komórek przeznaczonych do napromienienia proces napromieniania odbywa się automatycznie.

1. Wstęp

Badania wpływu promieniowania na organizmy żywe prowadzone są na świecie od wielu lat. O ile skutki somatyczne występujące przy znacznym napromienieniu organizmu zostały już dokładnie zbadane i opisane na podstawie obserwacji ofiar zdarzeń radiacyjnych [1,2], to wpływ niewielkich dawek promieniowania na organizm ludzki nie został jeszcze do końca poznany i nadal pozostaje przedmiotem dyskusji [3,4,5]. Ponieważ wpływ niewielkich dawek nie może zostać zarejestrowany na poziomie całego organizmu, zatem jego badanie możliwe jest tylko na poziomie komórkowym. W badaniach tych wykorzystywane są sztuczne linie komórek hodowanych w warunkach laboratoryjnych [6]. Metoda ta ma wiele zalet - hodowla komórkowa zapewnia kontrolę środowiska oraz powtarzalność wyników. Wychodzi ona również na przeciw żądaniom organizacji społecznych, domagających się ograniczenia eksperymentów prowadzonych na zwierzętach, co zostało poparte przez Parlament Europejski stosownym rozporządzeniem z 2010 roku [7].

W wielu laboratoriach do naświetlań kolonii komórkowych wykorzystywane są klasyczne, szerokowiązkowe źródła promieniowania. Badania te obciążone są jednak dużą niepewnością statystyczną przy oszacowaniu dawki promieniowania zdeponowanej w poszczególnych komórkach. Dlatego w badaniach mikrodozymetrycznych najlepiej sprawdzają się układy mikrowiązkowe, w których średnica użytej wiązki jest porównywalna ze średnicą pojedynczej komórki.

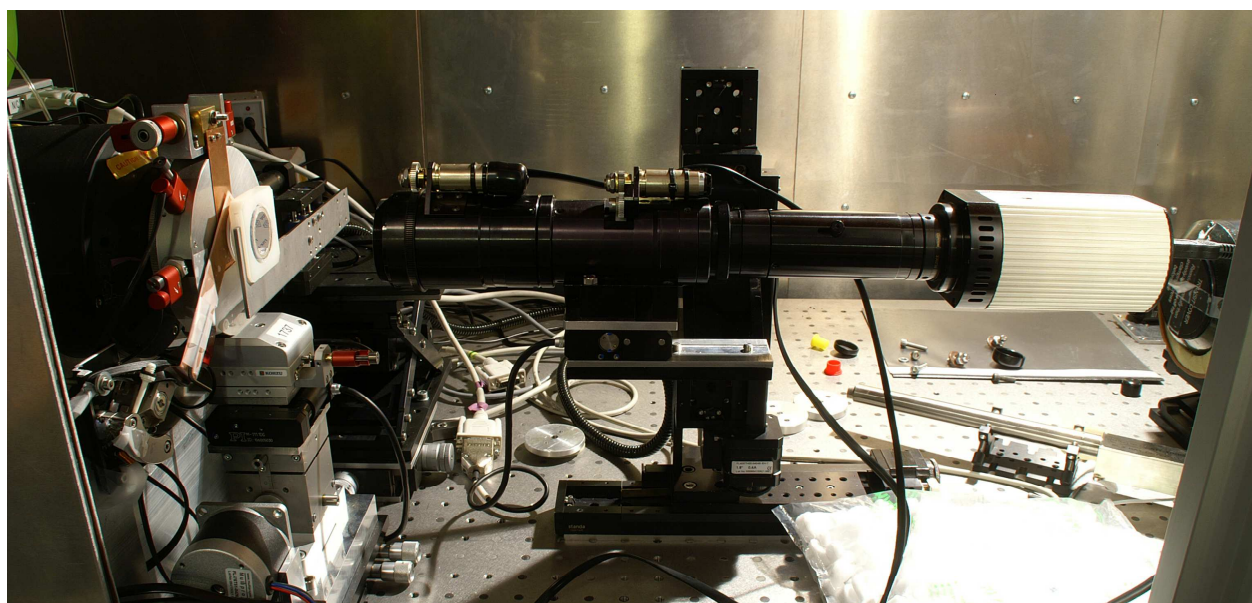
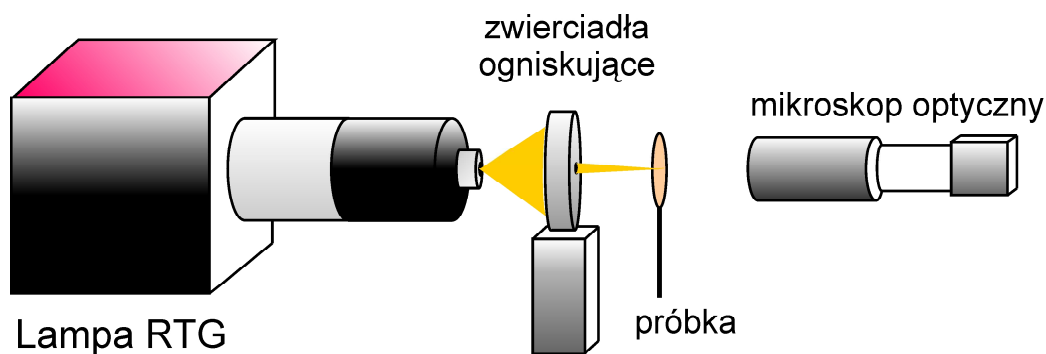


Rys. 1 Napromienianie komórek przy użyciu a) klasycznego źródła , b) układu mikrowiązki

W badaniach stosowane są mikrowiązki jonowe, wykorzystujące protony, cząstki alfa, oraz ciężkie jony, jak również mikrowiązki elektronowe oraz rentgenowskie [8]. Od 2004 roku w Instytucie Fizyki Jądrowej PAN funkcjonuje mikrowiązka jonowa, wykorzystująca protony o energii 2.5 MeV [9]. Jednak w trakcie badań diagnostycznych, jak również w środowisku naturalnym, człowiek narażony jest przede wszystkim na promieniowanie fotonowe, natomiast znacznie rzadziej na promieniowanie cząstek naładowanych. Ponieważ skutki biologiczne uszkodzeń radiacyjnych w komórce znacznie różnią się w przypadku cząstek i promieniowania fotonowego [10,11] dlatego celem uzupełnienia badań prowadzonych przy mikrowiązce jonowej, w 2006 roku w Zakładzie Spektroskopii stosowanej IFJ PAN zdecydowano się na rozpoczęcie budowy stanowiska mikrowiązki rentgenowskiej dla badań radiacyjnych [15,17].

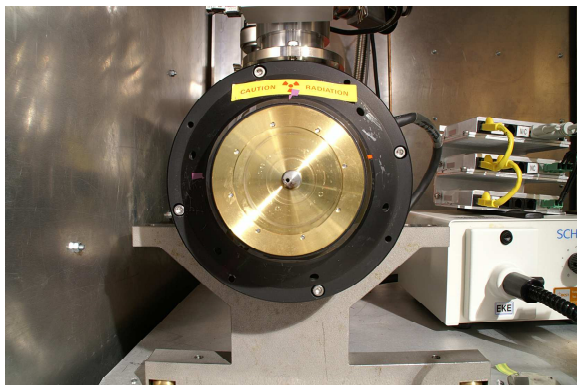
2. Schemat budowy układu

Linia eksperymentalna przeznaczona do naświetlań pojedynczych komórek promieniowaniem X składa się z lampy rentgenowskiej firmy Hamamatsu z mikroogniskowaniem i anodą transmisyjną, układu zwierciadeł wielowarstwowych firmy Rigaku ogniskujących promieniowanie X, układu pozycjonowania próbki, oraz mikroskopu optycznego z kamerą wraz z układem pozycjonowania [16] (Rys. 2). Lampa jest unieruchomiona, natomiast układ ogniskujący, próbka oraz mikroskop posiadają możliwość regulacji położenia w trzech kierunkach przestrzeni.



Rys. 2 Schemat oraz fotografia układu mikrowiązki rentgenowskiej do badań radiobiologicznych

Lampa rentgenowska Hamamatsu L9191 jest typu otwartej, co umożliwia wymianę anod i tym samym dostosowanie energii promieniowania do potrzeb eksperymentu. Wiązka promieniowania emitowanego z lampy jest rozbieżna i ma kształt stożka o kącie rozwarcia 120° . W eksperymencie radiobiologicznym stosowana jest anoda tytanowa, zatem w emitowanym przez lampę promieniowaniu na tle ciągłego widma promieniowania hamowania dominuje bardzo silna linia charakterystycznego promieniowania X dla $\text{Ti-K}\alpha$ o energii 4.5 keV. Stosunek natężenia tej linii do natężenia promieniowania hamowania osiąga najwyższą wartość przy napięciu lampy około 40 kV.



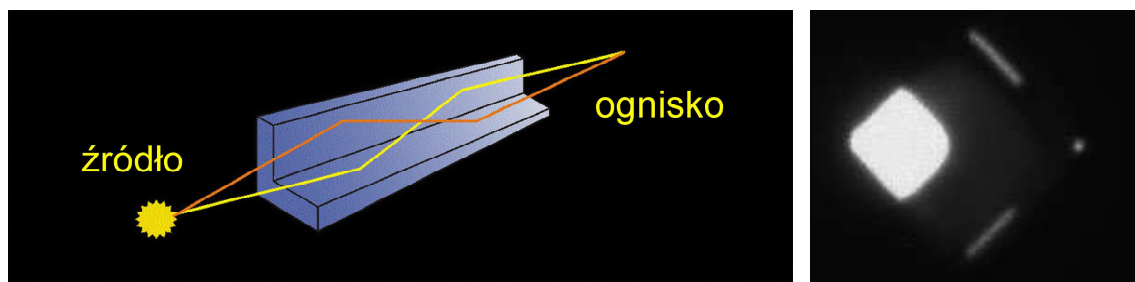
Rys. 3 Lampa Hamamatsu L9191 od frontu po zdemontowaniu anody, z widocznym w centralnej części mimośrodowym otworem, przez który padają na anodę emitowane przez lampę elektrony, powodując emisję promieniowania X. Rotacja anody powoduje zmianę miejsca padania elektronów, kiedy jej powierzchnia napromieniana w danym położeniu jest już "wypalona".

W chwili obecnej, oprócz układu opisanego w niniejszym raporcie, na świecie pracuje 11 mikrowiązek promieniowania rentgenowskiego dedykowanych do naświetlania *in-vitro* pojedynczych komórek. Wśród nich, w sześciu mikrowiązkach źródłem promieniowania jest lampa rentgenowska z mikro-ogniskowaniem [11,8,18,19,20]. Do eksperymentów prowadzonych na tych mikrowiązkach wykorzystywane jest promieniowanie charakterystyczne linii $K\alpha$ materiałów anodowych o energiach 0.28 keV (C- $K\alpha$), 1.49 keV (Al- $K\alpha$) lub 4.5 keV (Ti- $K\alpha$). Promieniowanie linii $K\alpha$ węgla jest praktycznie w całości pochłaniane przez pojedynczą komórkę, podobnie jak pochłaniane w znacznym stopniu promieniowanie linii $K\alpha$ linii aluminium (ok. 70%, w zależności od grubości komórki). W IFJ PAN planowane są także badania wpływu promieniowania na zbliżone do tkanki struktury trójwymiarowe, dlatego zdecydowano się na użycie anody tytanowej i tym samym dostosowanie układu ogniskującego do promieniowania linii Ti- $K\alpha$ o energii 4.5 keV. W grubości pojedynczej komórki promieniowanie o tej energii pochłaniane jest jedynie w 3-5 %, a połowę swojego natężenia wiązka traci dopiero po przejściu przez ponad 20 warstw komórek.

3. Ogniskowanie i optymalizacja wiązki

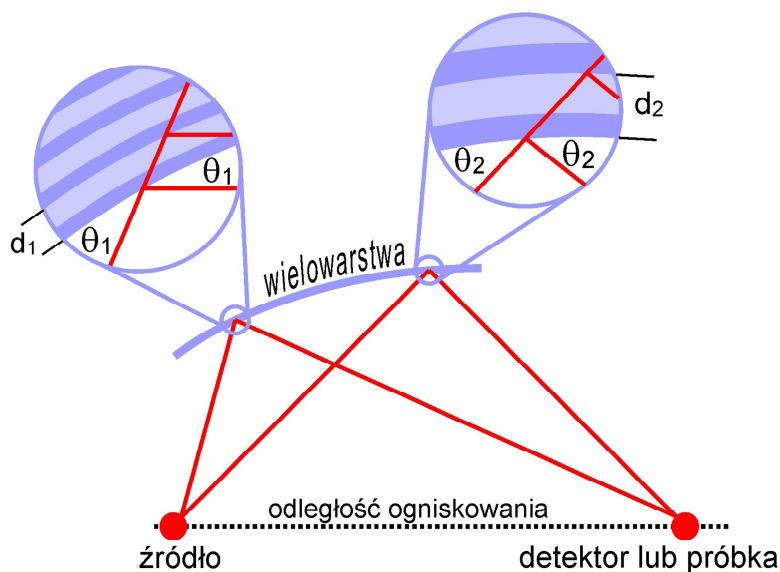
W przypadku stanowiska do naświetlań mikroobektów kluczowe znaczenie ma ponowne zogniskowanie rozbieżnej wiązki. Najbardziej odpowiednią metodą ogniskowania miękkiego promieniowania rentgenowskiego, równocześnie monochromatyzującą to promieniowanie, jest użycie soczewek Fresnela. Metoda ta została zastosowana w większości układów mikrowiązkowych przeznaczonych do napromieniania pojedynczych komórek. Jednak przy zachowaniu stałej długości ogniskowej kąt bryłowy, z którego soczewka Fresnela ogniskuje wiązkę, maleje wraz ze wzrostem energii promieniowania. Przy energii powyżej 3 keV korzystniejszy kąt bryłowy można uzyskać stosując metodę ogniskowania przy użyciu zwierciadeł wielowarstwowych, i dlatego ta właśnie metoda została zastosowana w układzie mikrowiązki rentgenowskiej w IFJ PAN.

Zastosowany układ ogniskujący firmy Rigaku składa się z dwóch zwierciadeł płasko-eliptycznych ustawionych wzajemnie prostopadle (geometria Montela Rys. 4a). Każde ze zwierciadeł ogniskuje wiązkę w jednej płaszczyźnie, a promienie odbite kolejno od obydwu lusterek są zogniskowane przestrzennie. Promieniowanie padające na powierzchnię zwierciadeł może przejść przez układ bez odbicia (największy obiekt na obrazie wiązki na Rys. 4b), może odbić się tylko od jednej z powierzchni (dwie ukośne linie na Rys. 4b), jak również może odbić się kaskadowo od obu powierzchni (Rys. 4a) tworząc właściwe ognisko (najmniejsza plamka na Rys. 4b). Odległość źródło-ognisko podana przez producenta wynosi 30 mm.



Rys. 4 a) Zasada działania zwierciadeł ogniskujących firmy Rigaku b) obraz wiązki po przejściu przez układ [14]. Duży romb z lewej strony pochodzi z bezpośredniej wiązki promieniowania X. Dwie ukośne linie pochodzą od promieniowania odbitego od jednego ze zwierciadeł. Najmniejsza plamka z prawej strony obrazu przedstawia zogniskowaną wiązkę promieniowania po odbiciu od obydwu zwierciadeł ogniskujących, co schematycznie ilustruje rysunek a).

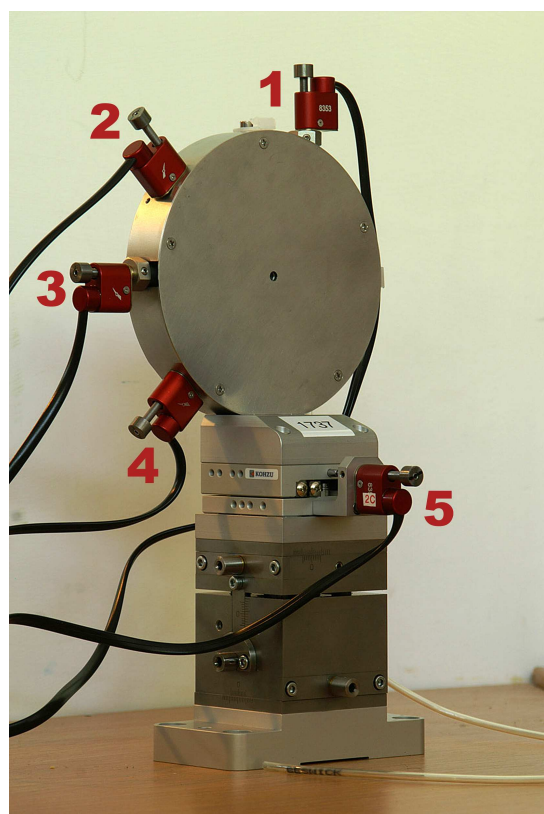
Efekt ogniskowania polega na wykorzystaniu konstruktywnej interferencji promieniowania rozproszonego na wielowarstwach zgodnie z regułą Bragga. Powierzchnia zwierciadeł pokryta jest powłoką ok. 80 dwuwarstw Cr/C o grubości tak dobranej, by dla promieni wychodzących ze źródła kąt padania/odbicia był równocześnie kątem Bragga dla energii 4.5 keV (Rys. 5). Zatem układ ogniskujący jest równocześnie monochromatyzatorem wiązki. Dla centralnej części zwierciadeł grubość pojedynczej dwuwarstwy Cr/C wynosi 3.1 nm.



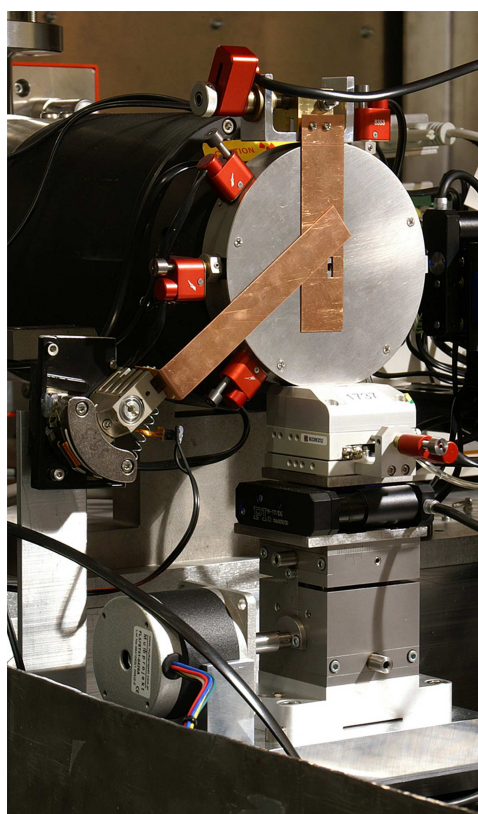
Rys. 5 Zasada ogniskowania przy użyciu wielowarstwy [12] opiera się na wykorzystaniu konstruktywnej interferencji promieniowania zgodnie z regułą Bragga.

Promieniowanie rentgenowskie rozkłada parę wodną i pary organiczne powodując powstawanie wolnych rodników, mogących uszkodzić powłokę na zwierciadłach. Dlatego zwierciadła umieszczone są w hermetycznej komorze zamkniętej okienkami berylowymi o grubości 0.05 mm i powinny pracować w próżni lub w atmosferze helu. Uwzględniając geometrię komory i zwierciadeł wewnątrz niej, jej przednia ścianka powinna być ustawiona ok. 2.5 mm od czoła lampy rentgenowskiej, a ogniska należy spodziewać się ok. 5 mm za tylną ścianką. W eksperymentach ognisko znaleziono ok. 7 mm za tylną ścianką, czyli prawdziwa odległość pomiędzy ogniskami elipsy wynosi nie 30, lecz około 32 mm.

Oryginalny układ zakupiony od producenta został dostarczony wraz ze stabilną podstawą, umożliwiającą regulację jego położenia w przestrzeni. Regulatory układu ogniskującego (czerwone moduły 1-5 na Rys. 6a) pozwalają na zautomatyzowaną optymalizację kątów Bragga (moduły 2, 4), wzajemnej prostopadłości dwóch powierzchni odbijających (moduł 1), pozycji wewnętrznej przesłony (moduł 3) oraz w niewielkim zakresie położenia układu w osi wiązki (moduł 5). Podstawa luster jest stabilna, niestety umożliwia ona tylko manualną zmianę położenia układu poprzez regulację trzech pokręteł (Rys. 6a). Automatyzacja ruchu ma istotne znaczenie. Każda manualna operacja na układzie w czasie pomiaru wiąże się z koniecznością wyłączenia lampy, odsunięcia szyby ołowianej oraz orientacyjnego przekręcenia regulatora przed kolejnym podglądem wiązki po zasunięciu szyby i ponownym uruchomieniu lampy. Konieczność wykonywania manualnych operacji w czasie eksperymentu znacznie go wydłuża, a praca lampy w takim przerywanym trybie nie wpływa korzystnie na jej żywotność. Wskazane zatem było zautomatyzowanie ruchu układu ogniskującego w płaszczyźnie prostopadłej do osi wiązki. Ruch w kierunku poziomym został zautomatyzowany poprzez umieszczenie pomiędzy układem ogniskującym a jego podstawą precyzyjnego pozycjonera krokowego firmy Physik Instrumente, poruszającego się z minimalnym krokiem $0.1 \mu\text{m}$. Z kolei do automatyzacji ruchu w osi pionowej wykorzystano jeden z regulatorów w oryginalnej podstawie, który obracany jest przy użyciu silnika krokowego. Dodatkowo cały układ zwierciadeł wraz z podstawą znajduje się na płycie posiadającej możliwość obrotu kąтового w pionie i poziomie. Wszystkie elementy przejściowe zostały zaprojektowane i wykonane w IFJ.



a)



b)

Rys. 6 a) Zwierciadła ogniskujące w oryginalnej postaci b) układ po modyfikacjach, widoczne miedziane przysłony sterujące strumieniem promieniowania X.

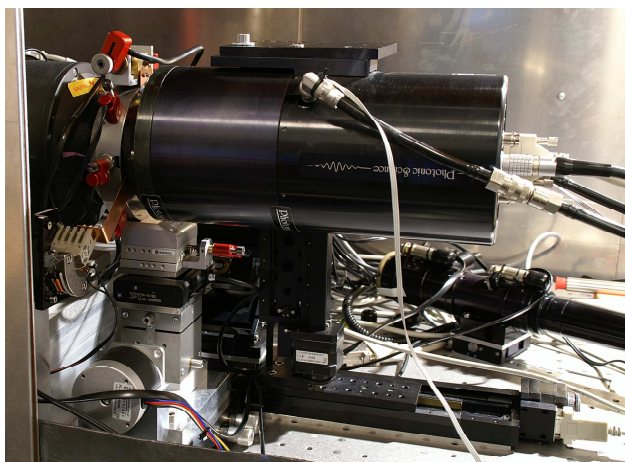
Właściwą wiązkę na Rys. 4b stanowi plamka otrzymana w wyniku kaskadowego odbicia promieni od obu wielowarstw. Pozostałe elementy obrazu muszą zostać przesłonięte. Oryginalna wewnętrzna przesłona luster okazała się niewystarczająca do tego celu, ponieważ wiązka bezpośrednio przenika przez nią w znacznym stopniu.



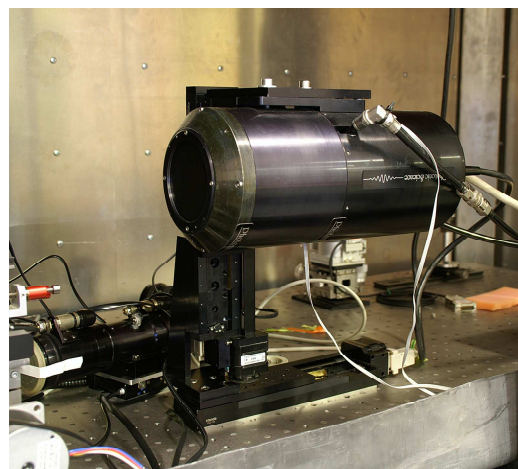
Rys. 7 Obraz częściowo przesłoniętej wiązki z widoczną "kometką" pochodzącą od wiązki bezpośredniej. Równoległe do granicy zdjęcia ostre odcięcie kometki w dolnej części "ogona" jest wynikiem zachodzenia przesłony zewnętrznej.

Dla precyzyjnych badań z mikrodozymetrii ważne jest określenie deponowanej dawki promieniowania, a przy tak znacznym udziale w widmie promieniowania polichromatycznego wiązki bezpośredniej było by to dość skomplikowane. Aby zminimalizować efekt wiązki bezpośredniej skonstruowano dodatkową przesłonę zewnętrzną przesłaniającą wiązkę wyjściową na zasadzie noża. Do miedzianego wysięgnika poruszanego silnikiem krokowym doklejona została cienka płytką wolframu skutecznie pochłaniająca wiązkę bezpośrednią. Rys. 6 przedstawia układ oryginalny oraz układ po modyfikacjach.

Obraz wiązki obserwowany jest na ekranie kamery CCD Photonic Science (Rys. 8) rejestrującej promieniowanie X [16]. Ekran stanowi matryca 4008 x 2670 detektorów, średnica każdego z nich wynosi 14.7 μm . Obraz w 12 bitowej skali szarości rejestrowany jest z częstotliwością 10 MHz. Kamera musi być zamocowana w pozycji podwieszanej, ponieważ tylko wtedy może zbliżyć się do miejsca, gdzie w odległości kilku milimetrów od powierzchni wnęki zwierciadeł znajduje się ognisko. Kamera jest chłodzona wodą prowadzoną przewodem wchodzącym z jednej i wychodzącym z drugiej strony obudowy. Praca kamery bez aktywnego chłodzenia może spowodować jej trwałe uszkodzenie. Brak dopływu wody sygnalizowany jest zmianą koloru niewielkiej diody w obudowie kontrolera z zielonego na czerwony. Ze względu na ograniczoną długość specjalistycznego przewodu, kontroler kamery znajduje się powyżej układu mikrowiązki, w miejscu, w którym niepozorna, aczkolwiek bardzo ważna sygnalizacja mogła by pozostać niedostrzeżona. Dlatego do metalowych części przewodu wodnego zamocowane zostały czujniki temperatury, których sygnał przekazywany jest na bieżąco do komputera.



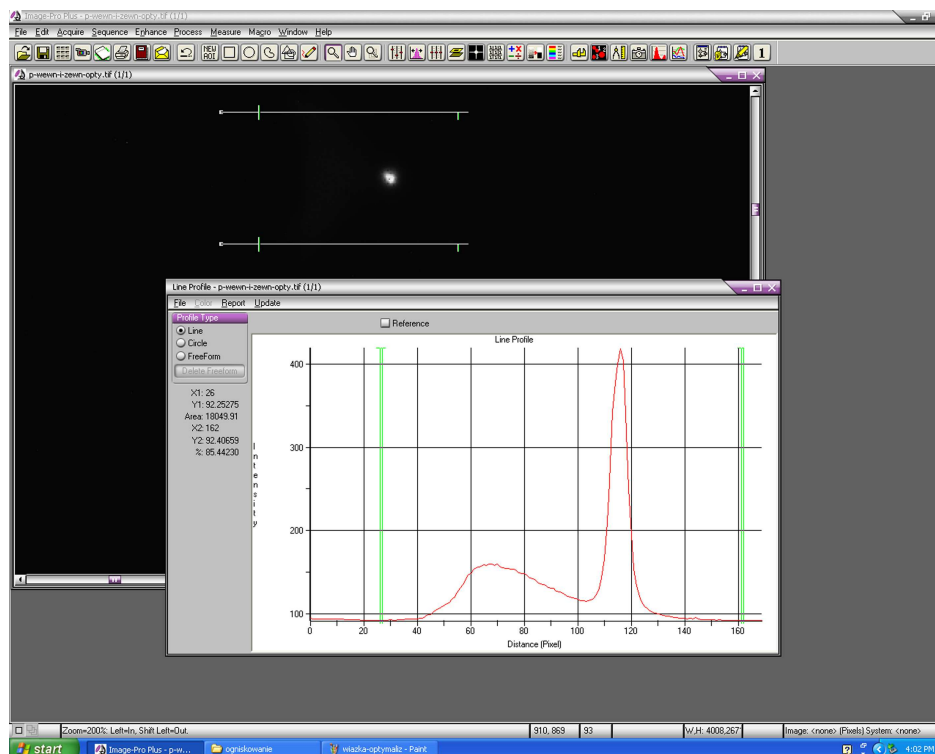
a)



b)

Rys. 8 Kamera CCD Photonic Science a) w czasie podglądu ogniska b) widok od przodu

Wyznacznikiem dla optymalizacji ogniska jest stosunek intensywności zogniskowanej plamki do intensywności pozostałych elementów na Rys. 4b. Po wstępnej optymalizacji wizualnej dalsza analiza odbywa się w oparciu o odczyt sumarycznej intensywności pikseli na obrazie plamki, zarówno w fazie dostosowywania orientacji przestrzennej elementu ogniskującego jak i przesłaniania pozostałych elementów.

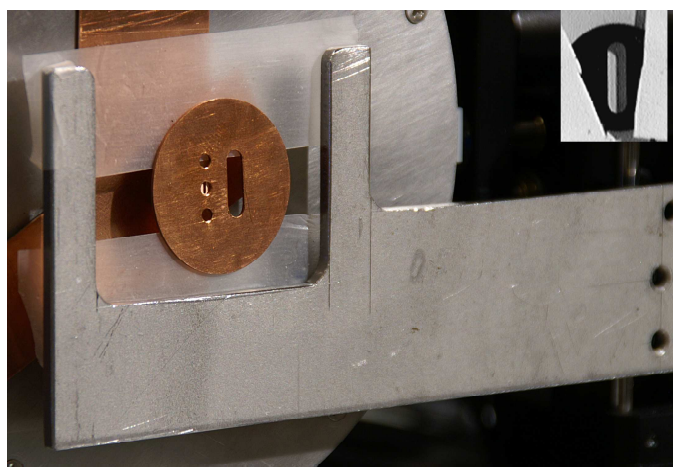


Rys. 9 Optymalizacja wiązki odbywa się na podstawie ciągłej analizy wykresu intensywności obrazu ogniska. Obie przesłony nie są w stanie całkowicie zasłonić polichromatycznej wiązki przechodzącej bezpośrednio z lampy. Proces optymalizacji zmierza do uzyskania jak największej intensywności piku pochodzącego od plamki przy możliwie jak najmniejszym udziale tła pochodzącego od wiązki bezpośredniej oraz jej rozproszeń.

Próbka oraz dodatkowe akcesoria wykorzystywane w trakcie przygotowywania układu do eksperymentu, tj. scyntylator i wzorzec rozdzielczości, mocowane są na wysięgniku w układzie pozycjonowania próbki. Położenie wysięgnika w płaszczyźnie prostopadłej do osi wiązki jest regulowane z rozdzielczością $0.1 \mu\text{m}$ przy użyciu pozycjonerów firmy Physik Instrumente, natomiast ruch układu próbki w osi pozostanie manualny do czasu implementacji kolejnego, zakupionego już pozycjonera.

4. Parametry zogniskowanej wiązki

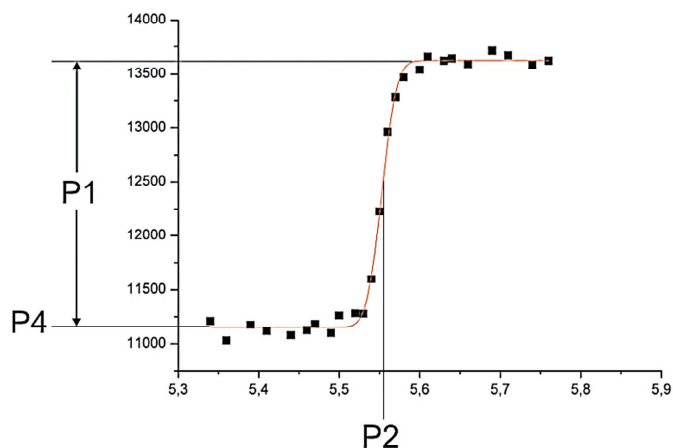
Po optymalizacji ogniska wykonywane są pomiary parametrów uzyskanej wiązki, tj. szerokości połówkowej piku, widma energetycznego oraz zbieżności wiązki. Szerokość połówkowa piku wyznaczana jest tzw. metodą noża [13]. Krawędź precyzyjne wyciętego otworu w cienkiej miedzianej folii przemieszczając się krokowo w kierunku poziomym (zazwyczaj z krokiem 0.01 mm zagęszczanym w okolicach środka wiązki) stopniowo przesłania wiązkę (Rys. 10a). Po każdym kroku pozycjonera ostrza rejestrowana jest intensywność plamki. Funkcją aproksymującą intensywność plamki w kierunku prostopadłym do osi wiązki jest krzywa rozkładu normalnego. Zależność intensywności plamki w funkcji położenia przesłaniającego ją ostrza tworzy funkcję będącą dystrybuantą rozkładu normalnego, lub konwolucją krzywej Gaussa i funkcji skoku jednostkowego (Rys. 10b,c).



a)



b)



c)

Rys. 10 Skanowanie wiązki metodą noża.

a) fotografia elementu ostrza,

b) krzywa przesłaniania jako wynik konwolucji krzywej Gaussa i funkcji skoku jednostkowego,

c) krzywa eksperymentalna uzyskana w odległości 1mm od ogniska. Krzywa ta aproksymowana jest funkcją postaci

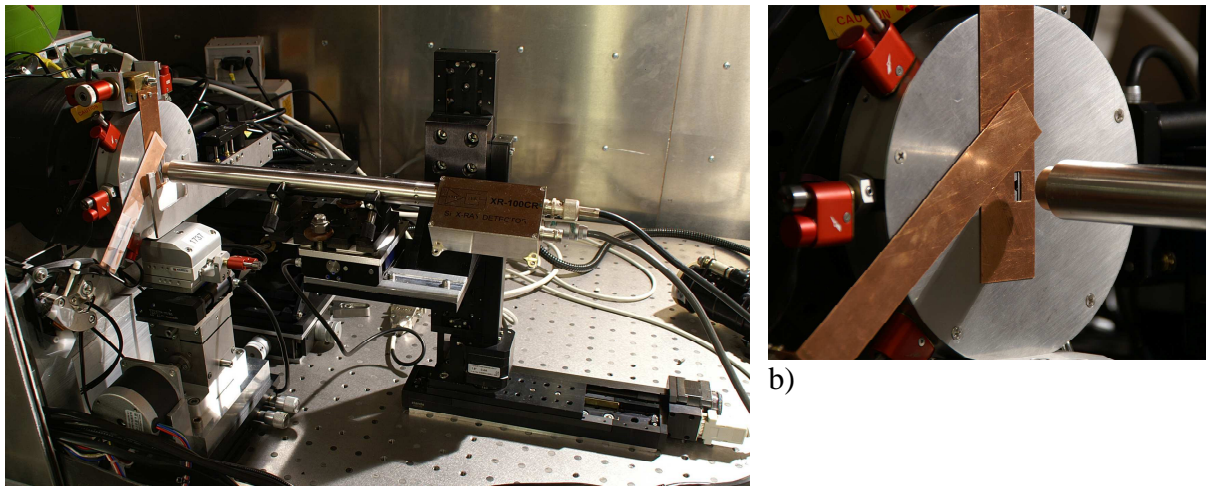
$$y = \frac{P1}{2} \left(1 + \operatorname{erf} \left(\frac{x - P2}{P3} \right) \right) + P4$$

Parametry P_i we wzorze są wyznacznikami parametrów ogniska następujących

- P1 - intensywność
- P2 - położenie
- P3 - szerokość
- P4 - poziom tła

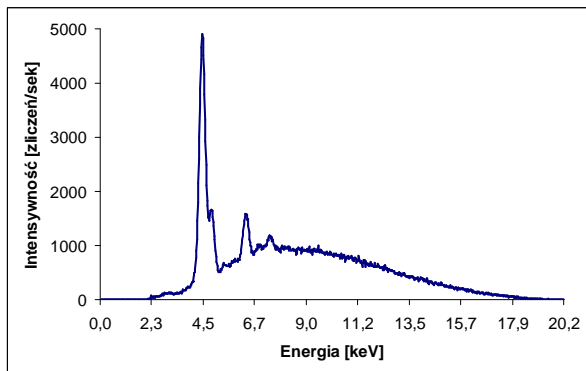
Skanowanie to odbywa się dla kolejnych położań wzdłuż osi wiązki w okolicach oczekiwanego ogniska. Standardowy krok w osi wiązki wynosi 1 mm, w okolicy ogniska jest zagęszczany. W ten sposób uzyskuje się profil wiązki oraz jej rozmiary w ognisku. Wyniki pierwszych pomiarów zostały przedstawione w pracy [15]. Obecnie, prawdopodobnie w wyniku zużycia powierzchni zwierciadeł szerokość połowkowa wiązki jest rzędu kilkunastu mikrometrów.

Pomiar widma jest wykonywany przy użyciu chłodzonego termoelektrycznie detektora Amptek [21] (Rys. 11). Detektor zamocowany jest na podstawie posiadającej możliwość w pełni zautomatyzowanej regulacji położenia w trzech kierunkach przestrzeni. W tym przypadku automatyzacja ruchu również ma istotne znaczenie - element czynny detektora ma powierzchnię zaledwie kilku milimetrów kwadratowych, a średnica wiązki jest rzędu kilkunastu mikrometrów. Ustawienie powierzchni czynnej detektora tak, aby była ona przecinana przez oś wiązki wymaga ciągłej obserwacji całkowitej częstości zliczeń rejestrowanego widma (jest ona w przybliżeniu równa intensywności pik o energii 4.5 keV).

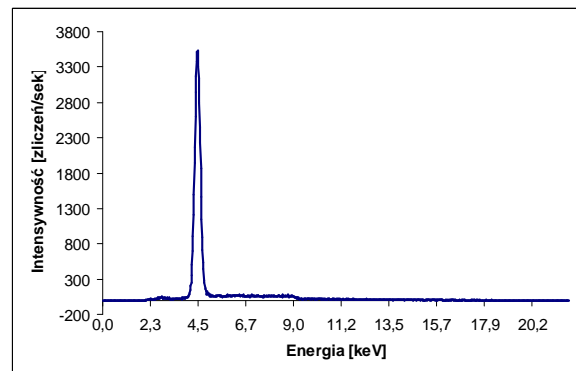


a)

b)



c)



d)

Rys. 11 a,b) Pomiar widma przy użyciu detektora Amptek c) widmo wiązki bezpośredniej d) monochromatyczne widmo wiązki zogniskowanej - pik o energii 4.5 keV

5. Układ mikroskopu i kalibracja obrazu

Kolejnym etapem w przygotowaniu układu do pomiarów jest właściwe ustawienie mikroskopu do podglądu próbki. Podobnie jak kamera CCD, mikroskop zamocowany jest w osi wiązki. Mikroskop i detektor Amptek wykorzystują ten sam układ pozycjonujący, zatem

mikroskop także posiada możliwość automatycznej regulacji położenia we wszystkich trzech kierunkach. Mikroskop posiada własne poprzeczne źródło światła, zmotoryzowaną regulację ostrości i odległości roboczej oraz zdolność rozdzielczą $1.5 \mu\text{m}$. Obraz z mikroskopu rejestrowany jest za pomocą kamery QICAM (firma QImaging).

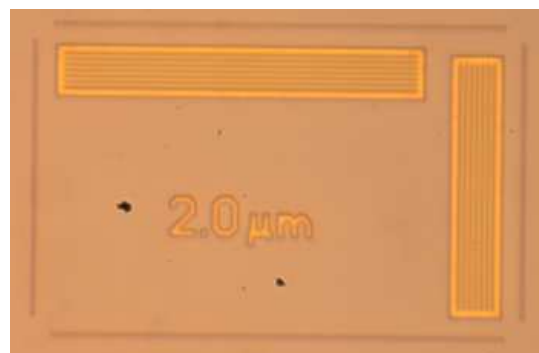


Rys. 12 Mikroskop z poprzecznym wewnętrznym oświetleniem. Światło doprowadzane jest ze źródła (firma SCHOTT) światłowodem. Widoczny joystick do automatycznej regulacji ostrości oraz powiększenia. Zdolność mikroskopu oszacowana na podstawie specjalnego wzorca (opisanego w dalszej części tekstu) wynosi ok. $1.5 \mu\text{m}$. Na zdjęciu widoczna jest niewielka analogowa kamera przemysłowa Watec, zakupiona wraz z mikroskopem. Jednak ze względu na wymagany długi czas ekspozycji obrazu została ona zastąpiona profesjonalną kamerą cyfrową przeznaczoną do badań naukowych.

QICAM to kamera cyfrowa o rozmiarze matrycy 1392×1040 pikseli, ściśle współpracująca z programem Image Pro (firma Media Cybernetics). Dokładne pozycjonowanie próbek, umożliwiające trafianie w pojedyncze komórki, wymaga wykalibrowania obrazu z kamery, tzn. przeliczenia odległości w pikselach na obrazie na rzeczywistą odległość w mikrometrach na szalce z komórkami. Kalibracja wykonywana jest przy maksymalnym powiększeniu mikroskopu. Do kalibracji wykorzystywany jest wzorec JIMA RT RC-02. Płytkę, w której znajduje się wzorec, mocowana na wysięgniku próbki (Rys. 13a). Na krzemowym okienku w znajdującym się w środku płytki znajduje się układ figur wykonanych z ołowianych pręcików o grubości $1 \mu\text{m}$. Cały układ figur ma wymiary $1.5 \times 1.5 \text{ mm}$. Głównym przeznaczeniem wzorca jest pomiar zdolności rozdzielczej lampy rentgenowskiej, jednak pozwala on również na określenie zdolności rozdzielczej układu optycznego, a także pomiaru precyzji i powtarzalności ruchu pozycjonerów poruszających wysięgnikiem próbki w płaszczyźnie prostopadłej do osi wiązki.

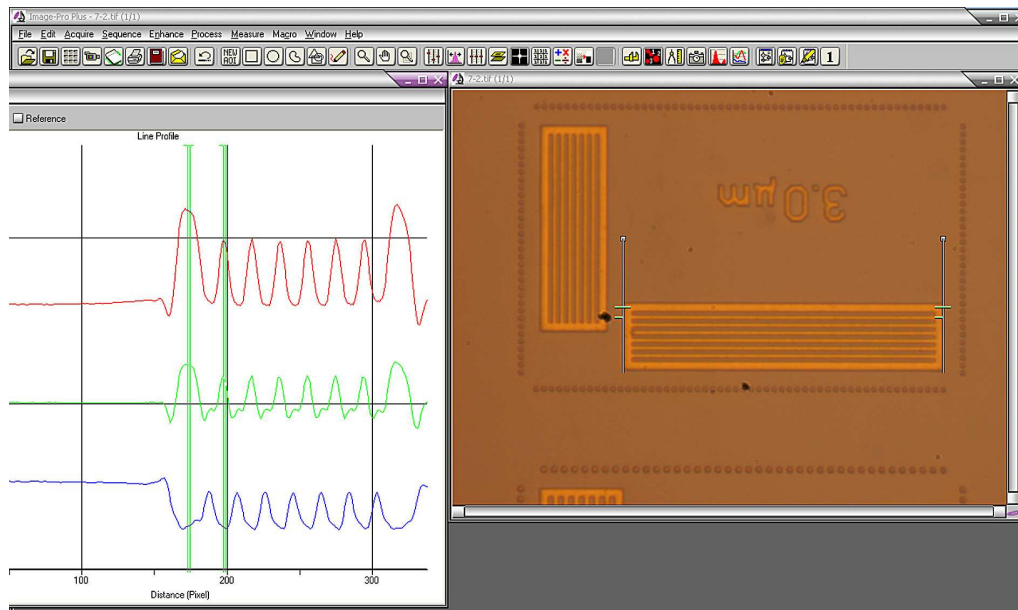


a)

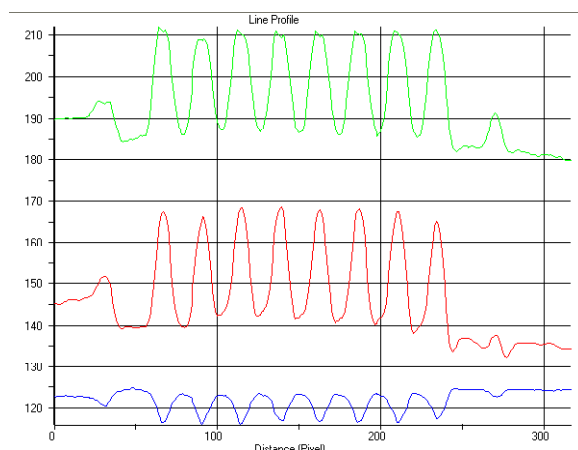
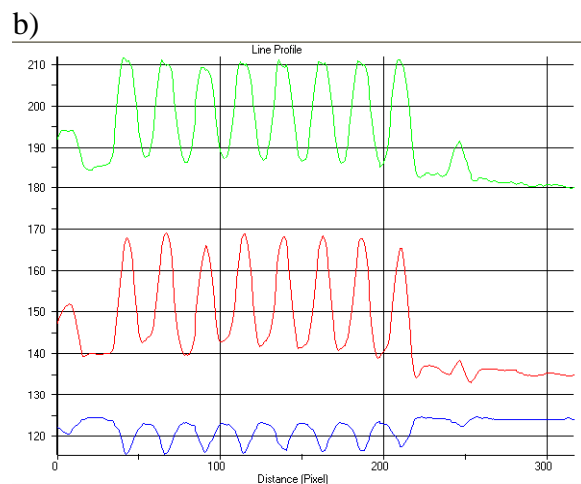


b)

Rys. 13 a) płytkę ze wzorcem do pomiaru zdolności rozdzielczej **b)** obraz elementów wzorca określający zdolność rozdzielczą układu optycznego.



Rys 14 a)



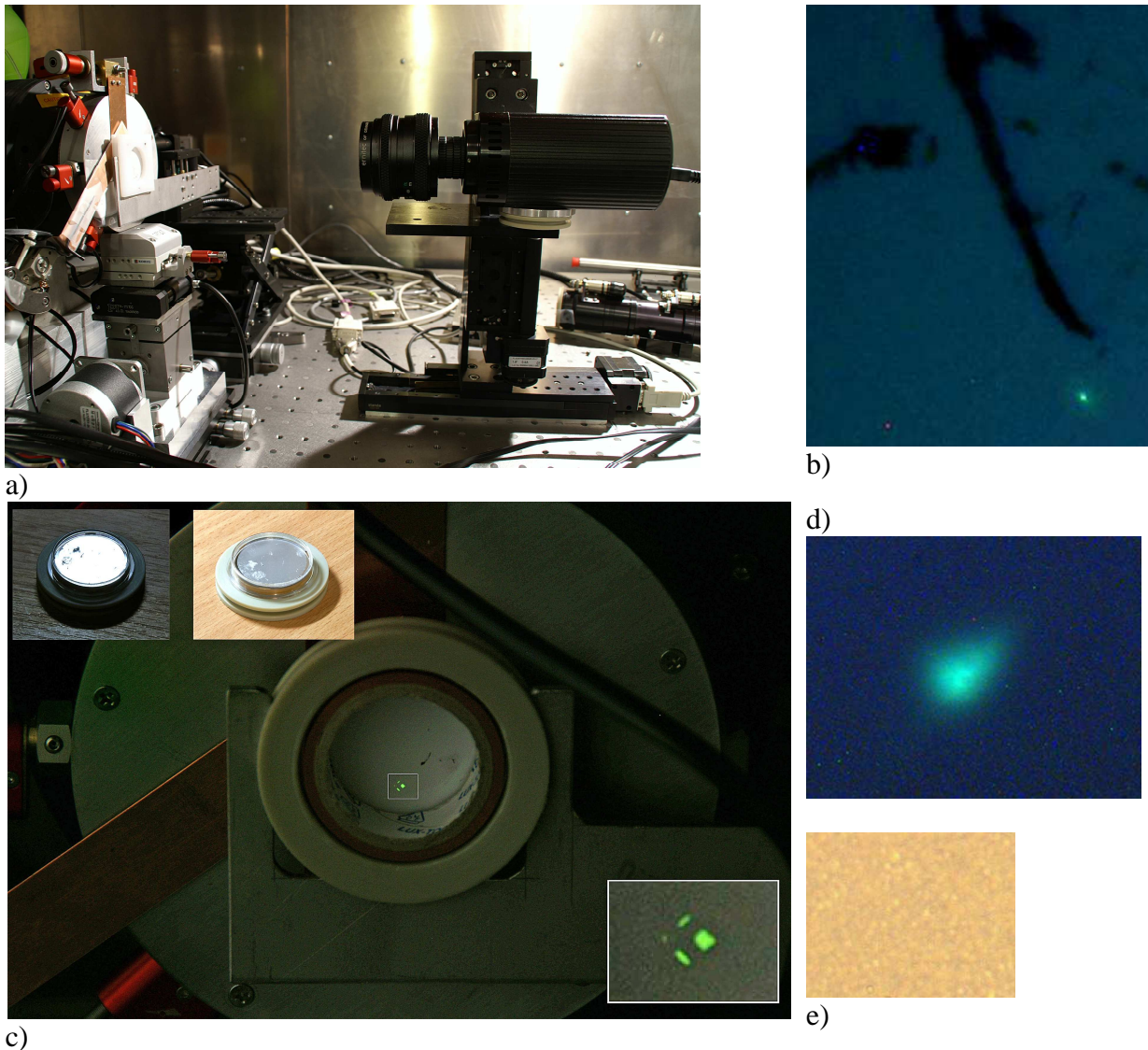
Rys. 14. a) Odległości pomiędzy maksimami (w pikselach) na wykresie intensywności obrazu oraz rzeczywiste odległości pomiędzy sąsiadującymi pręcikami pozwalają wyznaczyć współczynnik kalibracji obrazu $\mu\text{m}/\text{px}$.

b) Przesuwając pozycjonery o odległość równą odległości pomiędzy pręcikami można zweryfikować, czy położenia danych maksimów na wykresie pokrywają się z poprzednimi. W ten sposób można zweryfikować dokładność ruchu pozycjonerów.

Kolejną procedurą optymalizacyjną jest stabilizacja mikroskopu w położeniu, w którym przy maksymalnym powiększeniu wiązka znajduje się w okolicach środka obrazu kamery, a ognisko wiązki leży w płaszczyźnie ogniskowania mikroskopu.

Podgląd wiązki w mikroskopie optycznym możliwy jest przy zastosowaniu scyntylatora P43 (firma Proxitronic), przetwarzającego promieniowanie rentgenowskie na światło widzialne. Płytkę scyntylatora P43 umieszczona jest na wysięgniku w układzie pozycjonowania próbki. Jednak zanim możliwa będzie obserwacja wiązki w mikroskopie, jej położenie musi zostać zlokalizowane makroskopowo. Wynika to z faktu, że nawet przy najmniejszym powiększeniu mikroskopu obraz w kamerze obejmuje bardzo niewielki fragment scyntylatora. W całkowitej ciemności, gdyż tylko wtedy można zaobserwować wiązkę w scyntylatorze, czas akwizycji obrazu w mikroskopie jest długi (około minuty) ze względu na małą jasność układu optycznego. Skanowanie powierzchni scyntylatora w ciemności przy użyciu mikroskopu byłoby w zasadzie "błądzeniem po omacku".

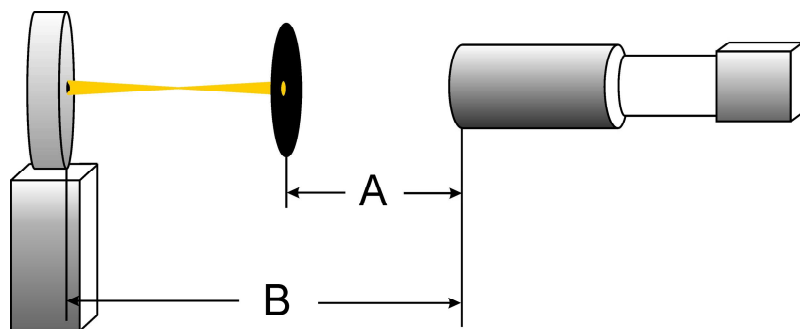
Do makroskopowej lokalizacji wiązki można wykorzystać kamerę QICAM, mocując do niej gwintowany obiektyw od starego aparatu analogowego wraz z pierścieniami pośrednimi. Jednak najprostszym i najskuteczniejszym sposobem jest zastosowanie cyfrowego aparatu fotograficznego, umieszczonego na statywie we wnęce pomiarowej. Wiązkę można zarejestrować wykorzystując program samowyzwalacza. Aparat ten musi być jednak dobrej jakości, gdyż czas naświetlania przy czułości matrycy 100 (ISO) wynosi 30 sekund.



Rys. 15. a) Obserwacja wiązki przy użyciu kamery z obiektywem b) obraz wiązki z kamery c) zdjęcie scyntylatora (aparatus cyfrowy na statywie) d) obraz wiązki w mikroskopie e) ziarna scyntylatora

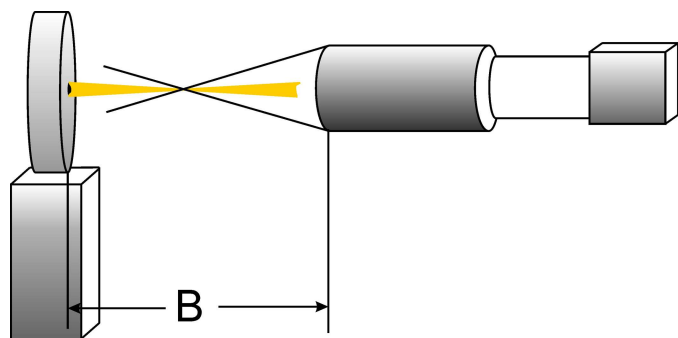
W oparciu o zdjęcie z aparatu, przy użyciu pozycjonerów próbki można wypozycjonować scyntylator tak, aby wiązka znajdowała się w pobliżu jakiegoś charakterystycznego punktu jego powierzchni, np. rysy. Wtedy, przy ustalonym położeniu scyntylatora i włączonym świetle, w te okolice należy skierować mikroskop, a następnie w ciemności znaleźć wiązkę przy minimalnym powiększeniu mikroskopu. W kolejnych krokach należy zwiększać powiększenie mikroskopu "centrując plamkę" tak, aby nie stracić jej z pola widzenia aż do uzyskania maksymalnego powiększenia mikroskopu. W tym ustawieniu czas akwizycji obrazu wiązki z Rys. 15d wynosi ok. 1 minuty. Długi czas akwizycji obrazu jest jednym z koniecznych wymagań, jakie powinna spełniać kamera, dlatego analogowa kamera przemysłowa Watec widoczna na Rys. 12 musiała zostać zastąpiona przez kamerę QICAM.

Ostatnim etapem pozycjonowania mikroskopu jest optymalizacja jego położenia w osi wiązki tak, aby ognisko wiązki znalazło się w płaszczyźnie ogniskowania mikroskopu. Kiedy mikroskop pracuje przy maksymalnym powiększeniu, scyntylator ustawiany jest w takiej pozycji, aby jego ziarna były wyraźnie widoczne w mikroskopie (Rys. 15e). W tej konfiguracji mikroskop i scyntylator, zachowując stałą odległość A od siebie, poruszają się w osi wiązki zmieniając odległość B w zakresie kilku milimetrów aż do uzyskania najmniejszej i najintensywniejszej plamki. Położenie wiązki na obrazie kamery jest zapamiętywane.



Rys. 16 Poszukiwanie ogniska

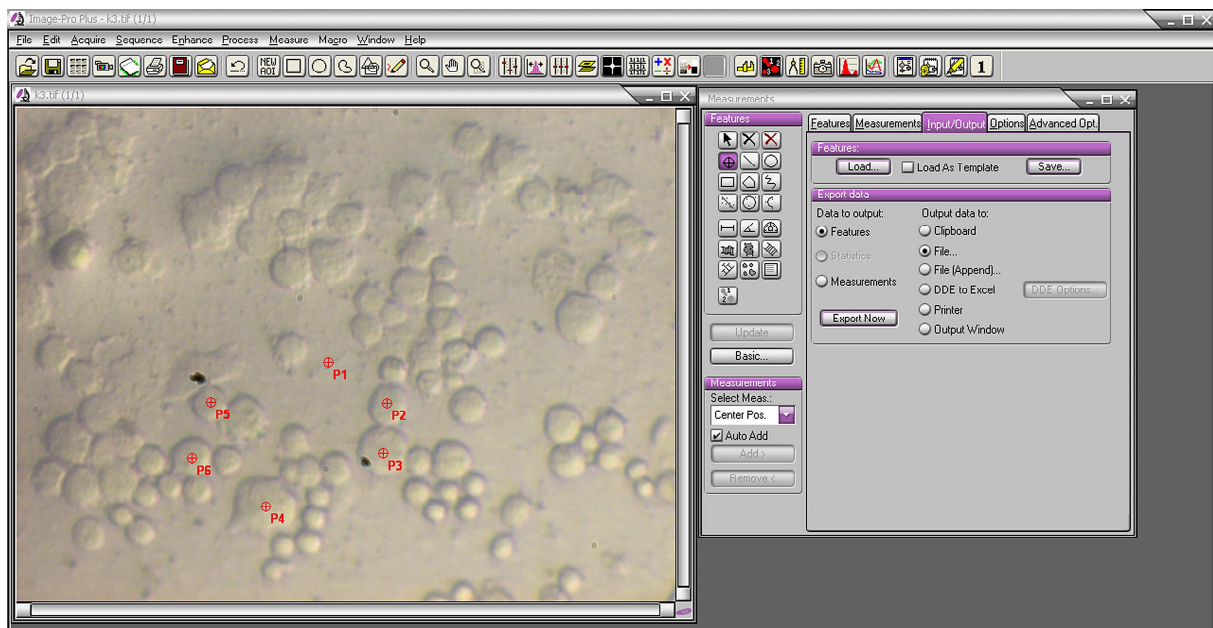
Po optymalizacji mikroskopu jego położenie jest ustalone i nie zmienia się w czasie eksperymentów. Odległość B zazwyczaj wynosi ok. 95 mm, a odległość scyntylatora od powierzchni luster B-A jest w granicach 4-7 mm. Po umieszczeniu szalki z komórkami należy ustawić ją tak, aby w mikroskopie komórki były wyraźnie widoczne. Wtedy znajdują się one w płaszczyźnie ogniska wiązki. W czasie naświetlania komórki są kolejno pozycjonowane w miejscu, w którym na zapisanym obrazie scyntylatora znajdowała się wiązka.



Rys. 17. Po optymalizacji położenia mikroskopu płaszczyzna ogniskowania mikroskopu i płaszczyzna na której leży ognisko pokrywają się. Obiekt do naświetlań widoczny w mikroskopie wyraźnie znajduje się w płaszczyźnie wiązki.

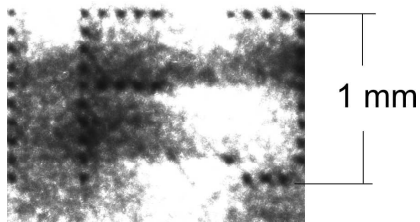
6. Napromienianie komórek

Proces napromienienia komórek realizowany jest zgodnie z następującą procedurą. Położenie poszczególnych komórek na szalce obrazowane jest za pomocą kamery współpracującej z programem Image Pro. Komórki przeznaczone do napromienienia oznaczane są manualnie (poprzez kliknięcie myszką). Następnie, pozycje komórek (w jednostkach pikseli) są eksportowane do pliku tekstowego. W oparciu o położenie wiązki na zapisanym obrazie (w jednostkach pikseli), pozycje komórek, wyznaczony współczynnik kalibracji obrazu (piksele / μm) oraz bieżące współrzędne pozycjonerów poruszających próbką (w milimetrach, z dokładnością do $0.1 \mu\text{m}$) obliczane są kolejne położenia pozycjonerów odpowiadające ustawieniu kolejnych komórek w osi wiązki.



Rys. 18 Oznaczenie komórek do napromienienia

Sam proces naświetlania sterowany jest przy pomocy programu napisanego w środowisku LabVIEW, który kontroluje ruch pozycjonerów oraz przesłony dozującej. Istnieje również możliwość napromieniania próbki według określonej trajektorii. Kolejne położenia pozycjonerów są w takim wypadku wczytywane z pliku tekstowego, zawierającego kolejne współrzędne. Rys. 19 przedstawia fragment kliszy stomatologicznej naświetlonej w ten sposób.



Rys. 19 Fragment kliszy stomatologicznej naświetlonej według określonej trajektorii tworzącej ciąg liter I F J. Zaczernienie kliszy w miejscach innych niż naświetlane było prawdopodobnie wynikiem zbyt długiego jej przechowywania w nieodpowiednich warunkach.

Proces naświetlania przedstawiony został w formie krótkiego filmu, dostępnego w internecie [14]. Procedury biologiczne oraz wyniki prowadzonych obecnie badań zostaną przedstawione w rozprawie doktorskiej mgr Sebastiana Bożka pt. "Konstrukcja i wykorzystanie mikrowiązki promieniowania X do badań organizmów żywych na poziomie komórkowym" oraz w publikacji naukowej.

Bibliografia

1. Y. Guo, Y. P. Zhu, J. Zhang, G. Ji and K. Wu, *Dose definition and physical dose evaluation for the human body in external radiation accidents*, Radiation Protection Dosimetry Vol. 77, No. 1/2
2. A.V. Sevan'kaev and others, *A cytogenetic follow-up of some highly irradiated victims of the Chernobyl accident*, Radiation Protection Dosimetry (2005) Vol. 113, No. 2
3. J. Liniecki, Z. Jaworowski, *Spór o hormezę*, Wiedza i Życie, nr 5/1998 <http://archiwum.wiz.pl/1998/98053000.asp>
4. K. Kant, S.K. Chakarvarti, *Radiation hormesis: the validity of the linear no-threshold hypothesis*, International Journal of Low Radiation, Volume 3, Number 1 / 2006, International Journal of Low Radiation, Volume 3, Number 1 / 2006
5. *Człowiek i promieniowanie jonizujące*, praca zbiorowa pod red. Andrzeja Z. Hrynkiwicza, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2001
6. *Hodowla komórek i tkanek*, praca zbiorowa pod red. Stanisławy Stokłosowej, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2004
7. *Directive 2010/63/EU of the European Parliament*, Official Journal of the European Union, L 276/33
8. *Microbeam Irradiation Facilities for Radiobiology in Japan and China*, J. Radiat. Res., 50: Suppl., A29-A47 (2009)
9. *Badanie reakcji komórek po naświetlaniu pojedynczymi jonami*, Wojciech Polak, Rozprawa doktorska Instytut Fizyki Jądrowej PAN im. Henryka Niewodniczańskiego w Krakowie, Kraków 2006
10. *Radiation Biophysics*, Edward L. Alpen, Academic Press 1990
11. *Two approaches for irradiating cells individually: A charged-particle microbeam and a soft X-ray microprobe*, M. Folkard et al, Nucl. Instr. Methods B130 (1997) 270
12. *Osmic MolyMax002 Röntgen-Generator Bedienungsanleitung* 470-003388 Rev. A, www.osmic.com.
13. http://massey.dur.ac.uk/resources/grad_skills/KnifeEdge.pdf

14. <http://www.microbeam.eu>
15. "*X-ray microprobe - A new facility for cell irradiations in Krakow*", Bozek S, Bielecki J, Baszak J, Doruch H, Hajduk R, Lekki J, Stachura Z, Kwiatek WM, Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B - Beam Interactions with Materials and Atoms, 267 (12-13): 2273-2276 JUN 15 2009
16. „*Multipurpose X-ray microprobe in the IFJ PAN – Technical description*”, J. Bielecki, S. Bożek, A. Banaś, J. Baszak, H. Doruch, R. Hajduk, J. Kowalska, T. Pieprzyca, Z. Szklarz, J. Lekki, Z. Stachura, W.M. Kwiatek, , Report No. 2025/AP, IFJ PAN, Kraków, 2009 (dostępny na <http://www.ifj.edu.pl/publ/reports/2009/>)
17. J. Lekki et al., *Design of the Kraków X-ray microprobe facility for targeted X-ray irradiations of biological objects*, J. Radiat. Res. 50, Suppl., (2009) A98
18. T. Kuchimaru et al., *Microdosimetric characteristics for micro X-ray beam for single cell irradiation*, IEEE Transactions on Nuclear Science 53 (2006) 1363
19. G. Schettino et al., *The Queen’s University variable-energy X-ray microbeam and its use in studying the dynamics of DNA damage and repair*, J. Radiat. Res. 50, Suppl., (2009) A96
20. M. Tomita et al., *Microbeam X-ray irradiation system at CRIEPI – Present status and biological experiments*, J. Radiat. Res. 50, Suppl., (2009) A99
21. <http://amptek.com/xr100cr.html>