



Středoškolská technika 2022

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

IMUNOANALÝZA CETUXIMABU ZNAČENÉHO Zr-89

Kamila Cidlinská

Gymnázium
Botičská 1, Praha 2

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto odbornou práci vypracovala samostatně pod vedením Markéty Kleinové a Ing. Jakuba Šafaříka. Dále prohlašuji, že jsem práci vypracovala pomocí legálního programového vybavení a že jsem uvedla veškeré použité zdroje informací.

Praha 17. května 2020

.....
Kamila Cidlinská

Poděkování

Ráda bych poděkovala Markétě Kleinové z Oddělení radiofarmak Ústavu jaderné fyziky Akademie věd ČR za poskytnutí vybavení a cenných rad. Dále děkuji i Ing. Jakubu Šafaříkovi za nápomocné připomínky.

Anotace

^{89}Zr -squaramid ester desferoxaminu-cetuximab má velké potenciální využití v diagnostice rakoviny pomocí pozitronové emisní tomografie (PET). Tato práce se zabývá jeho analýzou pomocí imunochemických metod ELISA a RIA. Teoretická část obsahuje přehled o všech složkách tohoto značeného konjugátu i stručné informace o použitých metodách.

Abstract

^{89}Zr -squaramide ester desferoxamine-cetuximab has a great potential in cancer diagnosis using positron emission tomography (PET). I have performed an assessment of this labeled conjugate through immunochemical methods ELISA and RIA. The theoretical part contains an overview of the radionuclide, chelator and antibody as well as brief information on the methods used.

Obsah

Úvod.....	8
Přehled literatury.....	9
Protilátky.....	9
Cetuximab.....	9
Chelátor.....	10
Desferoxamin.....	10
⁸⁹ Zr.....	10
ELISA.....	11
RIA.....	12
NaI(Tl) detektor.....	13
Metodika.....	15
ELISA.....	15
RIA.....	15
Výsledky a diskuse.....	Chyba! Záložka není definována.
Závěr.....	Chyba! Záložka není definována.
Seznam literatury.....	16

Úvod

Téma diagnostiky rakoviny je se stoupajícím počtem pacientů trpících tímto onemocněním stále aktuální. Jednou z metod sloužících tomuto účelu je pozitronová emisní tomografie (PET). Radionuklidem vhodným pro tuto metodu může být ^{89}Zr , jehož výhodou je poločas rozpadu odpovídající kinetice monoklonálních protilátek, např. cetuximabu. Značený konjugát ^{89}Zr -squaramid ester desferoxaminu-cetuximab by se tak mohl stát slibným radiofarmakem.

Toto téma jsem si vybrala ze zájmu o jadernou chemii. Doufám, že v budoucnu se má práce dočká i praktického využití.

Přehled literatury

Protilátky

Imunitní systém je soubor mechanismů v lidském těle, jejichž hlavní úlohou je rozpoznání vnějších i vnitřních škodlivin a obrana proti nim. Látky, na které imunitní systém reaguje, se nazývají antigeny. Imunitní mechanismy mohou být vrozené (nespecifické vůči antigenům) a adaptivní (antigenně specifické). Imunitu lze také rozdělit na humorální (týká se tělních tekutin) a buněčnou.

Protilátky neboli imunoglobuliny jsou proteiny, které slouží jako zprostředkovatelé humorální imunitní odpovědi. Jsou tvořeny živými organismy v reakci na přítomnost cizí látky – antigenu. Jejich molekula má tvar Y a obsahuje čtyři řetězce – dva těžké, které jsou spojeny disulfidickými můstky, a dva lehké. Tyto řetězce se skládají z několika domén – funkčních oblastí tvořených 110–120 aminokyselinami. V prostoru vypadají tyto domény jako válec tvořený polypeptidovými řetězci s disulfidickými můstky. Variabilní domény jsou u každé protilátky rozdílné. Vytváří vazebné místo pro antigen. Naopak zbytek domén, tzv. konstantní domény, se u protilátek stejné třídy neliší. Imunoglobuliny vznikají v plazmatických buňkách (plazmocytech).

Protilátky lze rozdělit podle původu na polyklonální a monoklonální. Polyklonální protilátky jsou produktem většího počtu buněčných klonů plazmocyků. Výsledná imunitní odpověď je namířena vůči několika antigenům. Monoklonální protilátky vznikají naopak jako produkt jednoho klonu plazmocyků. Díky tomu disponují unikátní vazebnou specificitou vůči jednomu antigenu. V lékařství se dříve používaly myší monoklonální protilátky, ovšem po jejich podání pacientům docházelo k imunitní reakci na cizorodou bílkovinu. Došlo tedy k vývoji tzv. chimérických protilátek, ve kterých je část molekuly, která netvoří vazebné místo na antigen, nahrazena odpovídající částí lidské protilátky. (1)

Cetuximab

Cetuximab (CTX) je monoklonální chimérická protilátka. Je specifická proti receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR), který patří mezi tyrosinkinázové receptory. EGFR se vyskytuje v buňkách epitelového původu, kde jeho signalizace ovlivňuje jejich růst, migraci či přežití. Při rakovinném bujení ovšem dochází k jeho nadprodukci. EGFR se nachází zejména v hlavě, krku, plicích či v tlustém střevě. (2) (3)

Cetuximab má 5 až 10krát vyšší afinitu k EGFR než endogenní ligandy tohoto receptoru (např. epidermální růstový faktor). Díky tomu blokuje jejich vazbu na EGFR a tím i inhibuje funkci celého receptoru. Cetuximab hraje také roli v protilátkové buňkami zprostředkované cytotoxicitě (ADCC). Používá se například při léčbě metastazujícího nádoru tlustého střeva či spinocelulárního karcinomu hlavy a krku. (3)

Chelátor

Chelátor je látka, která se váže na centrální kovový kation pomocí několika koordinačně kovalentních vazeb, čímž vytvoří komplex. Slovo chelátor pochází z řeckého *chele* (dráp), což popisuje způsob, jakým chelatační činidlo kovový ion obklopí. Mezi nejznámější chelátory lze zařadit například kyselinu ethylendiamintetraoctovou (chelatace olova a rtuti) či hem (chelatace železa). (4)

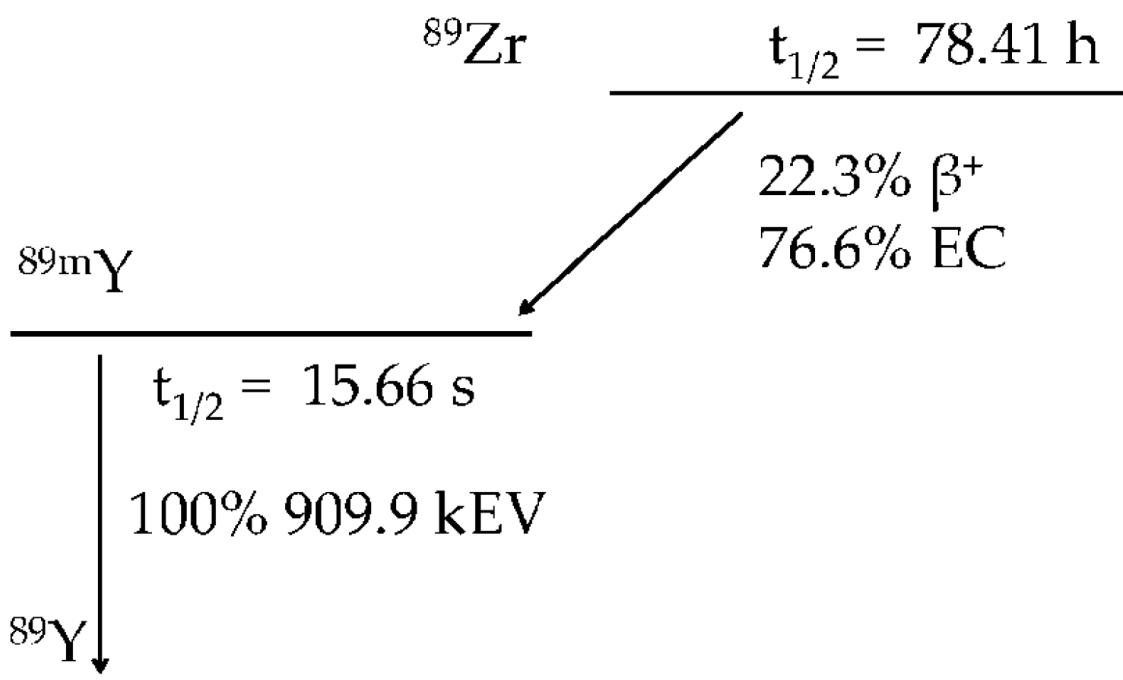
Desferoxamin

Desferoxamin (DFO) je chelatační činidlo. Jedná se o siderofor – slouží k zachycení a následnému přenosu železa do buňky. (5) Tvoří komplexy zejména se železem a hliníkem. Výsledné komplexy se pak vylučují močí a stolicí. Používá se při léčbě akutní otravy železem a chronického přetížení železem a hliníkem. (6) U DFO je donorem elektronového páru kyslík, což je velká výhoda u zirkonia, které má vysokou afinitu právě k tomuto prvku. Kvůli nedostatečné stabilitě komplexu DFO se zirkoniem *in vivo* bylo vyvinuto velké množství modifikací DFO přidáním např. halogenu, kyslíku či aminové skupiny. (7)

^{89}Zr

Zirkonium je chemický prvek vyskytující se v 4. skupině a 5. periodě periodické tabulky prvků. Jedná se o stříbrolesklý přechodný kov. Nejčastěji se nachází v oxidačním stavu +IV. Poměrně snadno tvoří komplexní sloučeniny, nejčastěji s koordinačním číslem 8. V přírodě se vyskytuje v pěti stálých izotopech: ^{90}Zr , ^{91}Zr , ^{92}Zr , ^{93}Zr a ^{94}Zr . Dalších dvacet osm izotopů, včetně ^{89}Zr , bylo uměle syntetizováno. Radioizotopy s protonovým číslem vyšším než 93 se rozpadají pomocí přeměny β^- , zatímco ty s protonovým číslem menším než 89 přeměnou β^+ . (8) (9)

^{89}Zr se rozpadá pomocí přeměny β^+ (22,3 %) a elektronového záchytu (76,6 %) na metastabilní úroveň yttria ($^{89\text{m}}\text{Yt}$), které se za vyzáření γ záření přemění na již stabilní ^{89}Yt . (10)



Obrázek 1 Rozpad ^{89}Zr (11)

^{89}Zr je slibným radionuklidem pro pozitronovou emisní tomografii (PET). Jeho výhodou je relativně dlouhý poločas rozpadu (78,4 h), který odpovídá kinetice navázané protilátky. Problémem může být naopak velká energie emitovaných pozitronů (909 keV), která představuje vysokou radiační zátěž pro pacienta. PET detektor měří pozici anihilace pozitronů, která se ovšem liší od místa pozitronové emise – vysoká energie pozitronů tím pádem vede také k nižšímu rozlišení výsledného obrazu na PET. (12) (13)

K přípravě ^{89}Zr se standardně používá terč z ^{89}Yt (tloušťka 0,1 mm, čistota >99,9%). Tento terč je ostřelován protony na cyklotronu, čímž dojde k produkci ^{89}Zr . Separací čistého zirkonia se zabývali např. Holland (14) či Verel (15). Verel nejprve terč rozpustil v kyselině chlorovodíkové. Díky přidání peroxidu vodíku bylo zirkonium oxidováno do oxidačního stavu +IV. ^{89}Y a jiné nečistoty byly vymyty po hodině pomocí extrakční kolonky, do které byla přidána kyselina chlorovodíková a destilovaná voda. K získání čistého ^{89}Zr byla použita kyselina šťavelová. Podle Hollanda však nemá přidání peroxidu vodíku na výslednou separaci žádný vliv.

ELISA

ELISA (z anglického enzyme-linked immunosorbent assay) je velmi rozšířená imunochemická metoda. Antigen je připevněn na destičku a je k němu přidán enzym vázaný na protilátku. Volné i vázané reaktanty se dají jednoduše oddělit pomocí vymytí. Výsledný barevný produkt, který poskytuje reakce sekundární protilátky s chromogenním substrátem, je vyhodnocen spektrofotometricky. Existuje několik uspořádání – přímá, nepřímá a sendvičová – lišících se množstvím antigenu a protilátky a jejich vzájemným uspořádáním. Všechny tyto metody mohou mít svou kompetitivní i nekompetitivní verzi.

V kompetitivní verzi antigen ze vzorku soutěží s referenčním antigenem o volná místa na protilátce. V nekompetitivní verzi se měří kvantita imunokomplexů. (16)

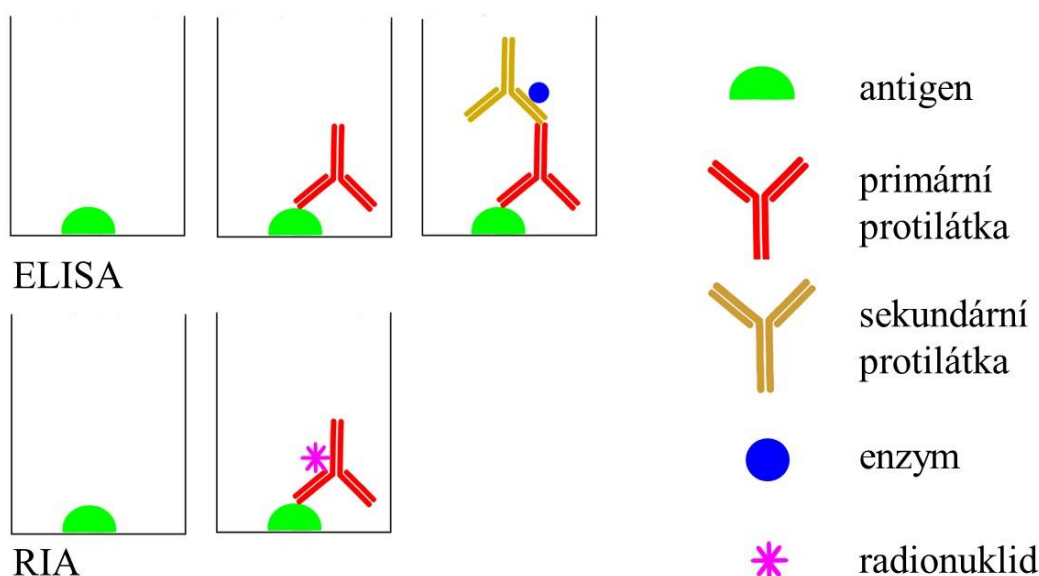
Dále se budu v přehledu literatury zabývat nepřímým nekompetitivním uspořádáním ELISA. Na mikrotitrační destičku je nanesen antigen. Je přidána primární protilátka, která se na antigen přichytí a inkubuje se. Přebytečné nepřichycené protilátky jsou vymyty. Na primární protilátku je poté nanesen konjugát sekundární protilátky s enzymem (přebytečný konjugát se opět vymyje). Po přidání substrátu se produkt zbarví a je možné ho změřit spektrofotometricky. (16)

ELISA pro stanovení množství CTX

Stanovením množství navázaného CTX na EGFR se zabývali např. Suárez a kol. (17) či Hantash a kol. (18) V obou případech bylo využito nepřímé nekompetitivní uspořádání ELISA. Antigenem je zde EGFR. Primární protilátkou je CTX (rozpuštěný v uhličitanovém pufru). Sekundární protilátka se lišila pouze ve svém původu, v obou případech se ale jednalo o IgG protilátku značenou peroxidázou. Jako blokovací a promývací roztok byl použit fosfátový pufr.

RIA

RIA (radioimmunoassay) je imunochemická metoda, která ke stanovení množství navázaného analytu využívá radionuklidem označenou protilátku či antigen. Antigen (popřípadě protilátka) je přichycen na pevný povrch a zachytí analyt ze vzorku. Druhá protilátka označená radionuklidem se naváže na analyt. Po inkubaci dojde k odmytí nepřichycených složek. Na konci se změří aktivita vzorku, ze které lze následně dopočítat i koncentraci. Dnes se tato metoda využívá především při terapeutickém monitorování koncentrací léčiv v krvi. (19)



Obrázek 2 Porovnání metod ELISA a RIA (autorka)

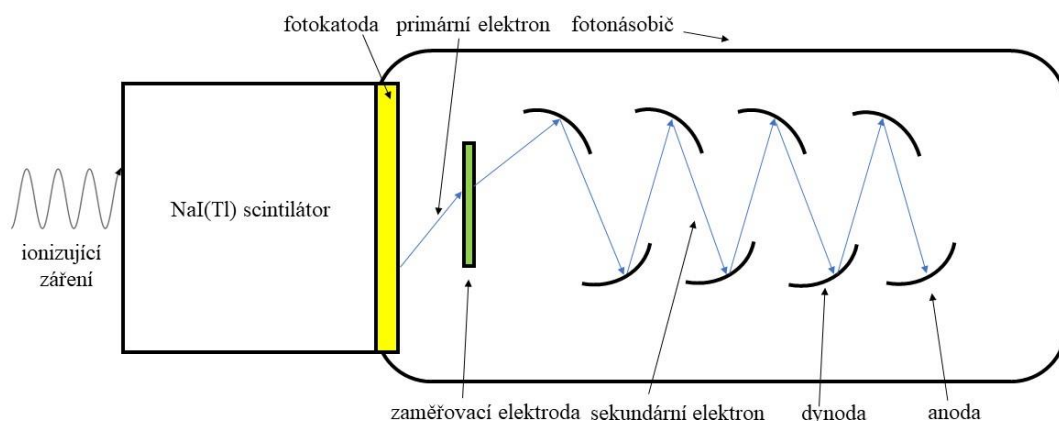
NaI(Tl) detektor

Pro vyhodnocení metody RIA se používá scintilační gama detektor, např. s krystaly jodidu sodného dopovaného thalliem. Projde-li ionizující záření anorganickým krystalickým scintilátorem, dojde k excitaci elektronů nacházejících se v jeho struktuře. Při jejich deexcitaci dojde k uvolnění fotonů. Ze scintilátoru přejdou fotony do fotonásobiče. Na fotokatodě se díky fotoelektrickému jevu uvolní elektrony. Ty jsou poté urychlovány na tzv. dynody, kde dojde kvůli dopadu k uvolnění většího počtu elektronů. Tyto elektrony jsou opět urychlovány a celý proces se opakuje. Výsledkem celého procesu je puls s dostatečně velkou amplitudou na měření. (20)

Gama záření nuklidu je detekováno a následně zpracováno elektronicky do výsledné podoby spektra, které se skládá z několika píků. Z tohoto spektra následně počítač spočte výslednou měrnou aktivitu:

$$A = \frac{N}{t \cdot I \cdot \eta \cdot m} \quad \text{Rovnice 1}$$

kde N – počet zachycených fotonů v píku po odečtení pozadí, t – čas (s), I – pravděpodobnost emise γ odpovídající energii píku daného radionuklidu, η – účinnost detektoru odpovídající energii píku v geometrii měření, m – hmotnost vzorku (kg). (21)
(22)



Obrázek 3 NaI(Tl) detektor (autorka, převzato z (23))

Vzhledem k tomu, že radionuklid se rozpadá i během měření, provádí se tzv. korekce na rozpad:

$$A = A_0 \cdot e^{-\frac{\ln 2}{t_{1/2}} t}$$

Rovnice 2

kde A – naměřená aktivita vzorku, A_0 – původní aktivita vzorku, $t_{1/2}$ – poločas rozpadu, t – čas, který uběhl od počátku měření.

Scintilační detektory jsou velmi oblíbené kvůli své vysoké přesnosti, jelikož fotonásobič je schopen znásobit počet elektronů více než desettisíckrát. Výhodou NaI(Tl) detektorů je i nízká vlastní absorpce scintilačního světla. Naopak nevýhodou je účinnost přeměny fotonů na elektrony, která se pohybuje okolo 20%. Limitující je u tohoto typu detektorů i vysoká hygroskopičnost, kvůli které musí být krystaly umístěny v utěsněném obalu, a velká náchylnost na změnu teplot. (20)

Metodika

Ve své práci jsem pracovala se značeným konjugátem ^{89}Zr -DFOSq-CTX. Nepřipravovala jsem ho, ale dostala jsem již finální přečištěný produkt se stanovenou koncentrací. Ten obsahuje radionuklid ^{89}Zr , chelátor squaramid ester desferoxaminu (DFOSq) a protilátku cetuximab (CTX). Výsledky jsem zpracovávala v programu Microsoft Excel.

ELISA

Pomocí nepřímého nekompetitivního uspořádání metody ELISA jsem určila, jaké množství značeného konjugátu se navázalo na antigen. Sestavila jsem kalibrační křivku závislosti absorbance na koncentraci a vypočítala koncentraci celé sloučeniny. Nejprve jsem do každé jamky na mikrotitrační destičce napipetovala 100 μl EGFR v 0,01M fosfátovém pufru (PBS) o koncentraci 1 $\mu\text{g}/1\text{ ml}$. Následovala inkubace 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté jsem destičku 3x promyla 200 μl 0,01M PBS. Pak jsem přidala 200 μl blokovacího roztoku – 1% hovězí sérový albumin (BSA) v 0,01M PBS a inkubovala 2 h při 37°C. Opět jsem destičku promyla a následně přidala 100 μl primární protilátky – cetuximabu. Protilátku jsem naředila v 1%BSA/0,01M PBS na koncentraci 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Následujících 11 vzorků bylo naředěno dvojkovou řadou. Značeného konjugátu jsem pipetovala také 100 μl . Jako negativní kontrolu jsem použila 100 μl 1%BSA/0,01M PBS. Inkubace probíhala 45 minut při 37°C. Poté jsem každou jamku opět opláchl a pipetovala 100 μl sekundární protilátky konjugované enzymem (Anti-Human IgG (Fc specific) – Peroxidase antibody produced in goat (Sigma)) ředěné v 1%BSA/0,01M PBS. Inkubovala jsem 30 minut při 37°C. Následně jsem přidala do každé jamky 100 μl chromogenního substrátu (5 ml 0,05M citráto-fosfátový pufr, 2 mg o-fenylendiaminu dichloridu, 5 μl 30% peroxidu vodíku). Inkubace poté probíhala 20 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Následně jsem celou reakci ukončila přidáním 100 μl 2M H_2SO_4 . Absorbanci jsem změřila spektrofotometrem (Tecan Sunrise Basic Microplate Reader) při 492 nm, referenční absorbance byla 620 nm.

RIA

Nejprve jsem do každé jamky na mikrotitrační destičce dala 100 μl antigenu EGFR o koncentraci 1 $\mu\text{g}/1\text{ ml}$ (ředěno v 0,01M PBS). Následně probíhala hodinu inkubace při laboratorní teplotě. Destička byla poté třikrát promyta roztokem 0,01M PBS (200 $\mu\text{l}/\text{jamka}$) a byl do ní přidán blokovací roztok (1% BSA v 0,01M PBS; 200 $\mu\text{l}/\text{jamka}$). Po dvouhodinové inkubaci při 37°C byla destička promyta stejně jako v předchozím případě. Přidala jsem 100 μl ^{89}Zr -DFOSq-CTX. Aktivity jednotlivých jamek byly změřeny na NaI(Tl) detektoru (Hidex Automatic Gamma Counter). Po 45 minut dlouhé inkubaci při 37°C byla destička opět promyta a její aktivita změřena na NaI(Tl) detektoru.

Seznam literatury

1. HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTŮŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák – Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.
2. URIBE, Mary Luz, Ilaria MARROCCO a Yosef YARDEN. EGFR in Cancer: Signaling Mechanisms, Drugs, and Acquired Resistance. *Cancers* [online]. 2021, **13**(11) [cit. 2023-05-11]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers13112748
3. **Cetuximab**
4. VITZ, Ed, John W. MOORE, Justin SHORB, Xavier PRAT-RESINA, Tim WENDORFF a Adam HAHN. *Chelating Agents* [online]. In: . Nice CXone Expert, 2022-04-03 [cit. 2023-14-03]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Book%3A_ChemPRIME_\(Moore_et_al.\)/22%3A_Metals/22.10%3A_Chelating_Agents](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Book%3A_ChemPRIME_(Moore_et_al.)/22%3A_Metals/22.10%3A_Chelating_Agents)
5. BELLOTTI, Denise a Maurizio REMELLI. Deferoxamine B: A Natural, Excellent and Versatile Metal Chelator. *Molecules* [online]. 2021, **26**(11) [cit. 2022-12-30]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26113255
6. Desferal – příbalová informace od SÚKL
7. FEINER, Irene V. J., Marie BRANDT, Joseph COWELL, Tori DEMUTH, Daniëlle VUGTS, Gilles GASSER a Thomas L. MINDT. The Race for Hydroxamate-Based Zirconium-89 Chelators. *Cancers* [online]. 2021, **13**(17) [cit. 2023-05-11]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers13174466
8. *The Periodic Table: Nature's Building Blocks* [online]. Elsevier, 2021 [cit. 2023-05-05]. ISBN 9780128212790. Dostupné z: doi:10.1016/C2019-0-03114-7
9. GREENWOOD, N. N. a A. EARNSHAW. *Chemistry of the elements*. 2nd ed. Boston: Butterworth-Heinemann, c1997. ISBN 0-7506-3365-4.
10. YOON, Joon-Kee, Bok-Nam PARK, Eun-Kyoung RYU, Young-Sil AN a Su-Jin LEE. Current Perspectives on ⁸⁹Zr-PET Imaging. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(12) [cit. 2023-03-14]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21124309
11. BHATT, Nikunj B., Darpan N. PANDYA a Thaddeus J. WADAS. Recent Advances in Zirconium-89 Chelator Development. *Molecules* [online]. 2018, **23**(3) [cit. 2023-03-14]. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23030638.
12. JØDAL, L, C LE LOIREC a C CHAMPION. Positron range in PET imaging: non-conventional isotopes. *Physics in Medicine and Biology* [online]. 2014, **59**(23), 7419-7434 [cit. 2023-05-10]. ISSN 0031-9155. Dostupné z: doi:10.1088/0031-9155/59/23/7419
13. ZHANG, Yin, Hao HONG a Weibo CAI. PET Tracers Based on Zirconium-89. *Current Radiopharmaceuticalse* [online]. 2011, **4**(2), 131-139 [cit. 2023-05-16]. ISSN 18744710. Dostupné z: doi:10.2174/1874471011104020131
14. HOLLAND, Jason P., Yiauchung SHEH a Jason S. LEWIS. Standardized methods for the production of high specific-activity zirconium-89. *Nuclear Medicine and Biology* [online]. 2009, **36**(7), 729-739 [cit. 2023-03-14]. ISSN 09698051. Dostupné z: doi:10.1016/j.nucmedbio.2009.05.007
15. IRIS, Verel, Visser GERARD, Boellaard RICHARD a Marijke STIGTER-VAN WALSUM. ⁸⁹Zr immuno-PET: Comprehensive procedures for the production of ⁸⁹Zr-labeled monoclonal antibodies. *Journal of Nuclear Medicine* [online]. 2003, **44**(8), 1271-81 [cit. 2023-05-11].
16. CROWTHER, J. R. *The ELISA guidebook*. 2nd ed. New York, NY: Humana Press, c2009. ISBN 978-1-60327-253-7.

17. SUÁREZ, Inmaculada, Antonio SALMERÓN-GARCÍA, José CABEZA, Luis Fermín CAPITÁN-VALLVEY a Natalia NAVAS. Development and use of specific ELISA methods for quantifying the biological activity of bevacizumab, cetuximab and trastuzumab in stability studies. *Journal of Chromatography B* [online]. 2016, **1032**, 155-164 [cit. 2023-14-03]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2016.05.045
18. HANTASH, Jamil, Mary SMIDT a Ronald R. BOWSER. The development, optimization and validation of an ELISA bioanalytical method for the determination of Cetuximab in human serum. *Analytical Methods* [online]. 2009, **1**(2) [cit. 2023-05-12]. ISSN 1759-9660. Dostupné z: doi:10.1039/b9ay00027e
19. WILD, David, ed. The immunoassay handbook: theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, c2013. ISBN 978-0-08-097037-0.
20. AHMED, Syed Naeem. *Physics and engineering of radiation detection*. Amsterdam: Academic Press, 2007. ISBN 978-0-12-045581-2.
21. ALI, Ammir Hassan, Ahmed Khalaf MHEEMEED a Hana Ihsan HASSAN. Efficiency Calibration Study of NaI(TL) Detector for Radioactivity Measurements in Soils from Ain Zalah Oil Field. *World Applied Sciences Journal*. 2014, **32**(3), 359-367. Dostupné z: doi:10.5829/idosi.wasj.2014.32.03.955
22. VANRAMLAWMA, -, - HMINGCHUNGNUNGA, - REMLALSIAMA, et al. Measurement of natural radioactivity using NaI (TI) detector in soil samples collected from Aizawl, Mizoram, India. In: *Proceedings of the Mizoram Science Congress 2018 (MSC 2018) - Perspective and Trends in the Development of Science Education and Research* [online]. Paris, France: Atlantis Press, 2018, 2018, - [cit. 2023-04-10]. ISBN 978-94-6252-638-9. Dostupné z: doi:10.2991/msc-18.2018.36
23. QWERTY123UIOP. *PhotoMultiplierTubeAndScintillator* [online]. In: . 2013-11-30 [cit. 2023-03-18]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:PhotoMultiplierTubeAndScintillator.jpg>