

التطبيقات التشخيصية والعلاجية

للقدائف النانوية الفلزية

Diagnostic and Therapeutic Applications of Metal Nanoshells

كريستوفر لو، واليكس لين، وليون هيرش، مين-هو لي، وجنيفر بارتون، ونومي هلس،
جنيفر وست، وريبيكا دريزك

Christopher Loo, Alex Lin, Leon Hirsch, Min-Ho Lee, Jennifer Barton, Naomi Halas, Jennifer West, and Rebekah Drezek

المخلص Abstract

إن الأصداف النانوية الفلزية، هي نوع مبتكر من جسيمات نانوية كروية مركبة، تتكون من قلب عازل من السيليكا مغطى بصدفة (بقشرة) فلزية رقيقة، وتكون من الذهب في الحالة النموذجية. وتملك الأصداف النانوية خواص بصرية وكيميائية مناسبة جداً للتصوير الطبي الحيوي والتطبيقات العلاجية. ويمكن تغيير الرنين البصري لهذه الجسيمات النانوية بدقة وبشكل نظامي على منطقة واسعة من الطول الموجي للأشعة فوق البنفسجية القريبة، إلى منتصف الأشعة تحت الحمراء، عن طريق تغيير الأبعاد النسبية للقلب والصدفة. ويتضمن هذا المدى منطقة الأشعة تحت الحمراء القريبة (NIR)، حيث قمم النفاذية النسيجية. بالإضافة إلى الانضباطية الطيفية، توفر

الأصداف النانوية مزايا أخرى مقارنة بعوامل تصوير الصبغة العضوية التقليدية ، تشمل الخواص البصرية المحسنة ، وثباتاً عالياً لخواصها الكيميائية/الحرارية الطبيعية. وعلاوة على ذلك ، يتم تعديل البروتوكولات المترافقة المستخدمة نفسها ؛ لربط الجزيئات الحيوية إلى غروي الذهب بسهولة للأصداف النانوية. وفي هذه المقالة ، نستعرض أولاً تشييد أصداف الذهب النانوية ، ونوضح كيف تؤثر نسبة القلب/الصدفة ، والحجم الكلي للأصداف النانوية على خواص الامتصاص والانتشار (التشتت). ثم نوضح عدة أمثلة للأساليب العلاجية والتشخيصية المستندة على الأصداف النانوية ، والتي تتضمن تطوير مترافقات أصداف نانوية حيوية للتصوير الجزيئي ، واستخدام انتشار الأصداف النانوية كعوامل تباين للتصوير الشعاعي الطبقي المترابط بصرياً (OCT) ، واستخدام امتصاص الأصداف النانوية في العلاج الحراري بالأشعة تحت الحمراء القريبة NIR للأورام.

١٢،١ المقدمة Introduction

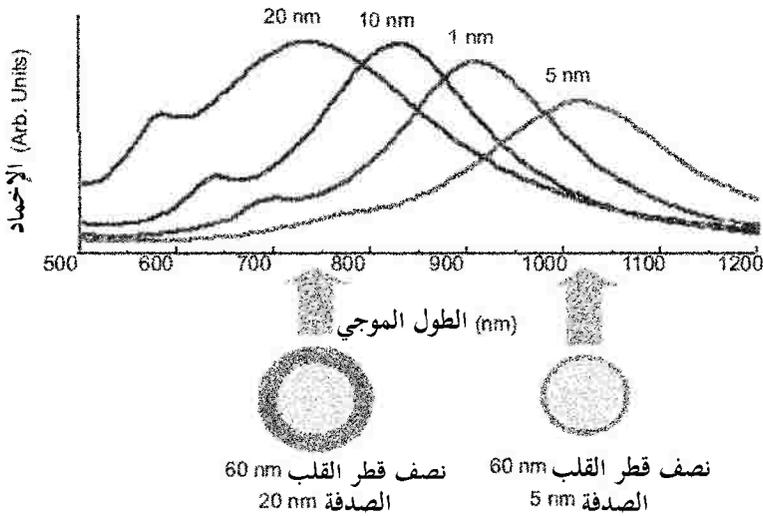
هناك حاجة سريرية مهمة لوجود طرائق مبتكرة لاكتشاف السرطان وعلاجه ، بحيث يكون لها حساسية محسنة ، وتخصيصية ، وتكلفة مناسبة. في السنوات الأخيرة ، أثبت عدد من المجموعات البحثية أن التقنية المستندة على الفوتونيات (علم الفوتونات) photonics القيمة المناسبة في معالجة هذا الاحتياج [14-17]. وتبشر التقنيات البصرية بدرجة وضوح عالية ، وتصوير وظيفي موسع للنسيج ، وبكلفة تنافسية. ومع ذلك ، وفي العديد من الحالات ، تكون هذه التقنيات محدودة من قبل الإشارات البصرية الضعيفة أصلاً من حاملات الألوان ذاتية المنشأ ، والفروق الطيفية بالغة الصغر بين النسيج الطبيعي والمريض.

وعلى مدى السنوات العديدة الماضية، كان هناك اهتمام متزايد بدمج التقنيات البصرية المستحدثة، مع تطوير وتصميم عوامل تباين خارجية جديدة؛ لتقصي المؤشرات (أو الإشارات) النوعية الجزيئية للسرطان؛ ولتحسين حدود الكشف والفعالية السريرية من التصوير البصري. وعلى سبيل المثال، عرض سوكولوف Sokolov وآخرون [1] مؤخراً استخدام غروي الذهب المترافق للأجسام المضادة لمستقبل receptor عامل نمو البشرة (EGFR)، كعوامل تباين للتشتت للتصوير البصري الجزيئي الحيوي لخلايا سرطانية عنقية وعينات نسيجية. وبالإضافة إلى ذلك، تم وصف تطبيقات التصوير البصري لمترافقات البلورة النانوية الحيوية من قبل مجموعات بحثية متعددة، تشمل بروتشيز Bruchez وآخرين [2]، وتشان ونيه Chan and Nie [3]، وأكيرمان Akerman وآخرين [4]. وحديثاً جداً، حدث تطور مهم في خلق تقنيات أنظمة تشغيل، أساسها تقنية النانو، التي قرنت إستراتيجيات الكشف الجزيئي النوعي المبكر مع التدخل العلاجي الملائم، وقدرات الرصد (المراقبة).

إن الأصداف النانوية الفلزية نوع جديد من الجسيمات النانوية، تتكون من قلب عازل، مثل السيليكا، مغطاة بطبقة فلزية فائقة الرقة، عادة الذهب. وتمتلك أصداف الذهب النانوية خواص فيزيائية مشابهة لخواص غروي الذهب، وعلى وجه الخصوص، امتصاص بصري قوي؛ نتيجة للاستجابة الإلكترونية الجماعية من الفلز للضوء. ويُعطي الامتصاص البصري لغروي الذهب لونا أحمر لامعا، والذي كان له استخدام كبير في المنتجات الطبية المتعلقة بالمستهلك، مثل اختبارات الحمل المنزلية. وعلى النقيض من ذلك، تعتمد الاستجابة البصرية للأصداف الذهبية النانوية بشكل كبير على الحجم النسبي لقلب الجسيمات النانوية، وسمك القشرة الذهبية. ومن خلال تغيير حجم القلب النسبي وسمك القشرة، يمكن تغيير الاستجابة البصرية لأصداف

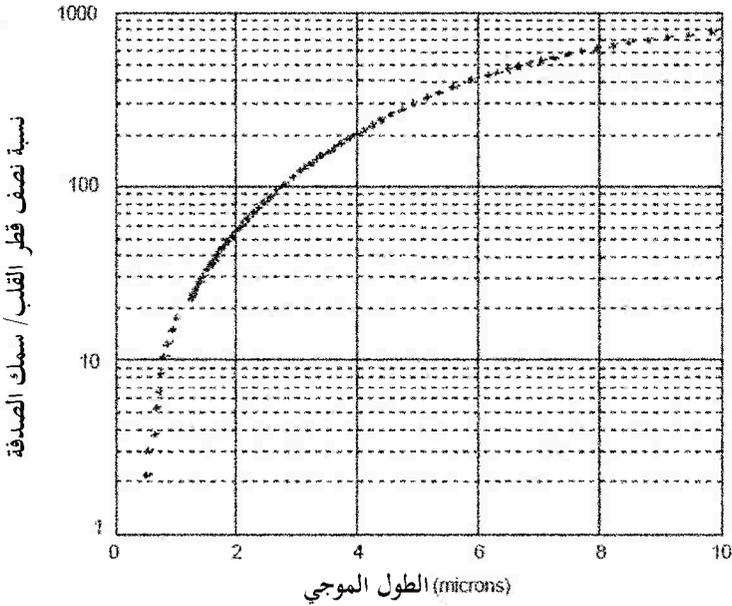
الذهب النانوية عبر مدى عريض من الطيف البصري، يمتد عبر منطقتي طيف الأشعة تحت الحمراء القريبة NIR والمنطقة المرئية [5,6].

يمكن أن تُصنع الأصداف النانوية الذهبية، إما لأن تمتص أو تشتت الضوء بشكل تفضيلي، وذلك من خلال تغيير حجم الجسيمات، نسبة إلى طول موجة الضوء عند رنينها البصري. ويعرض الشكل الرقم (١٢,١) رسم تشتت مي Mie؛ لإزاحة طول موجة رنين بلازمون للصدفة النانوية، كدالة في تكوينها، لحالة صدفة نانوية سيليكيا/ذهب بقلب ٦٠ نانومتر. وفي هذا الشكل، يتم عرض القلب والصدفة من الجسيمات النانوية إلى المقياس النسبي مباشرة تحت رنينها البصري المطابق.



الشكل رقم (١٢,١). رسم تشتت مي Mie للرنين البصري لأصداف نانوية (بقلب سيليكيا/وصدفة ذهبية) كدالة لنسبة صدفتها/ إلى قلبها. وتتوافق الأطياف الخاصة مع الجسيمات النانوية المصورة أسفل الشكل.

ويعرض الشكل رقم (١٢،٢) رسم نسبة الصدفة/للقلب مقابل طول موجي الرنين لجسيمات نانوية صدفة ذهبية/بقلب سيليكيا [6]. و"الانضباطية (التناغمية)" "tunability" السريعة جداً من الرنين البصري، هي خاصية فريدة من نوعها للأصداف النانوية. في أي تركيب جسيم نانوي أو جزيئي آخر، يمكن لرنين خواص الامتصاص البصرية أن يكون "مصمماً" بشكل منظم جداً.



الشكل رقم (١٢،٢). نسبة القلب/للصدفة كدالة لطول موجي رنين الأصداف النانوية (سيليكيا/ ذهب).

لقد أكمل هالاس Halas وزملاؤه دراسة شاملة في الخواص البصرية للأصداف النانوية الفلزية [7]، وتوصلوا إلى ملاءمة كمية بين نظرية تشتت مي، والخواص الرنانة البصرية المرصودة تجريبياً. واستناداً على هذا النجاح، يكون من الممكن الآن تصميم أصداف ذهبية نانوية بشكل تنبؤي بالخواص الرنانة البصرية المطلوبة، وذلك لصناعة

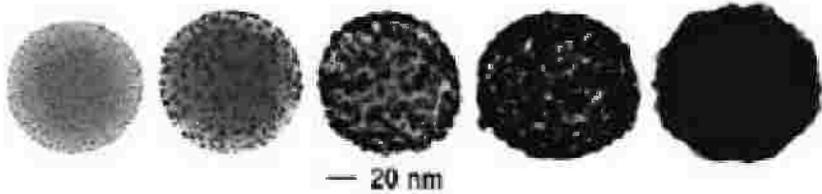
صدفة نانوية بأبعاد ودرجات التفاوت النانومترية اللازمة لتحقيق هذه الخواص [6]. إن بروتوكول التشييد المطور لتصنيع أصداف الذهب النانوية بسيط جداً في المفهوم:

١-إنماء أو الحصول على جسيمات السيليكا النانوية مشتتة في المحلول.

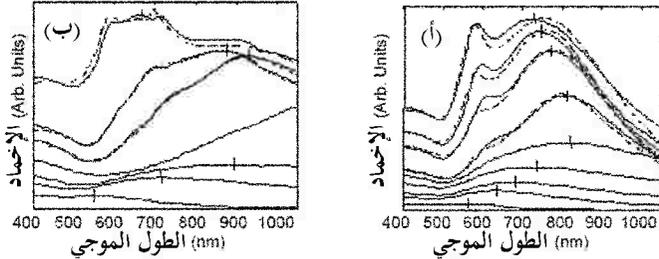
٢-ربط غروي فلز صغيرة جداً "بذور" (بمجم ١-٢ نانومتر)، بسطح الجسيمات النانوية عبر الروابط الجزيئية، وتقوم هذه الغرويات البذرية بتغطية سطوح الجسيمات النانوية العازلة بطبقة غروية فلزية متقطعة.

٣-إنماء فلزي إضافي على مميزات غروي الفلز "البذري" عبر الاختزال الكيميائي في المحلول.

وقد استُخدم هذا الأسلوب بنجاح لإنماء كل من أصداف الذهب والفضة الفلزية على جسيمات السيليكا النانوية. المراحل المختلفة لنمو الصدفة الذهبية الفلزية على جسيمات السيليكا النانوية الوظيفية مبينة في الشكل رقم (١٢،٣)، كما يعرض الشكل الرقم (١٢،٤) الإشارة البصرية من التحام الصدفة النانوية، ومن نمو قطرين من أقطار قلبي صدفتين نانويتين مختلفتين.



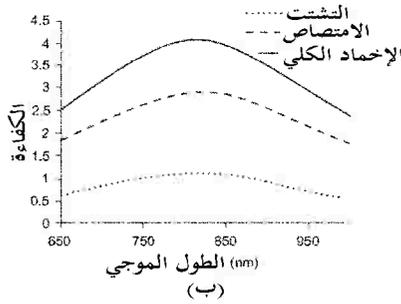
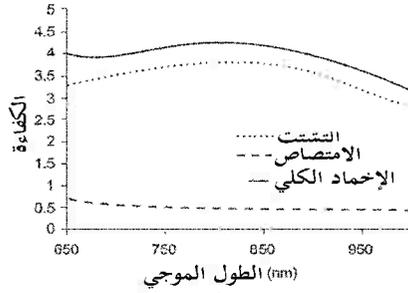
الشكل رقم (١٢،٣). صور المجهر الإلكتروني النفاذ لأصداف السيليكا/ الذهب النانوية أثناء نمو الصدفة.



الشكل رقم (٤، ١٢). (أ) نمو صدفه الذهب على جسيمات السيليكا النانوية بقطر ١٢٠ نانومتر. المنحنيات الطيفية الأقل، تتبع تصاعد الامتصاص البصري كالتحام تقدم طبقة الذهب. وبمجرد اكتمال الصدفه، يتم إزاحة قمة الامتصاص إلى أطوال موجية أقصر. ويتم رسم القمم النظرية المناظرة بالخطوط المتقطعة. (ب) نمو صدفه الذهب على جسيمات السيليكا النانوية بقطر ٣٤٠ نانومتر. وإزاحات القمة هنا أكثر وضوحاً مع كنف المنحنى الأوسط فقط، المرئي في مدى جهازنا.

على أساس نسب الصدفه/للقلب، والتي يمكن تحقيقها بهذا البروتوكول، يمكن الآن تصنيع أصداف ذهب نانوية برنين بصري، يمتد من المنطقة المرئية إلى ما يقرب من ٣ ميكرومتر في منطقة الأشعة تحت الحمراء. وهذه المنطقة الطيفية تتضمن المنطقة من ٨٠٠-١٣٠٠ نانومتر "نافذة للمياه"، من الأشعة تحت الحمراء القريبة، وهي المنطقة ذات النفاذية الفسيولوجية العالية، والتي وُصفت على أنها المنطقة الطيفية الأنسب للتصوير الحيوي البصري، ولتطبيقات الاستشعار الحيوي [18]. وعندما تقترن الخواص البصرية لأصداف الذهب النانوية هذه، مع توافقها الحيوي وسهولة اقترانها الحيوي؛ تصبح هذه الجسيمات النانوية مناسبة جداً للتصوير الحيوي الموجّه (المستهدف)، ولتطبيقات العلاج. وبالتحكم في البارامترات الفيزيائية للأصداف النانوية، يكون من الممكن هندسة الأصداف النانوية التي تشتت الضوء أولاً، مثلما ستكون مرغوبة للعديد من تطبيقات التصوير، أو بدلاً من ذلك، لتصميم الأصداف النانوية التي تكون ماصات قوية، والسماح لتطبيقات علاج أساسها يكون حرارياً

بصرياً. ويتم شرح محاكاة التشتت والامتصاص عبر الأقسام في الشكل رقم (١٢،٥)، والذي يعرض أطيف العينة لاثنتين من أشكال الصدفية النانوية، أحدهما مصمم لتشتت الضوء، والآخر لامتصاص الضوء بشكل تفضيلي.



الشكل رقم (١٢،٥). قد تكون الأصداف النانوية مصممة؛ لكي تمتص أو تشتت الضوء في الغالب عن طريق تكييف القلب، و مواد تصنيع الصدفية. ولشرح هذا المفهوم، تم توضيح كفاءة التشتت المتوقعة، وكفاءة الامتصاص، والإخماد لصدفتين من الأصداف النانوية: (أ) شكل التشتت (نصف قطر القلب = ٤٠ نانومتر؛ سمك الصدفية = ٢٠ نانومتر). (ب) شكل الامتصاص (دائرة نصف القلب = ٥٠ نانومتر؛ سمك الصدفية = ١٠ نانومتر).

لأنه يتم إخماد الطبقة الفلزية للأصداف الذهبية النانوية باستخدام التفاعل الكيميائي نفسه، كتنشيد غروي الذهب، فإن سطوح الأصداف الذهبية النانوية، تكون تقريباً مماثلة كيميائياً لأسطح الجسيمات الذهبية النانوية المستخدمة عالمياً في مجال

التطبيقات الحيوية المقترنة. لقد بدأ استخدام غروي الذهب في التطبيقات البيولوجية منذ عام ١٩٧١م، عندما اخترع فولك وتايلور Faulk and Taylor طريقة صبغ المناعة الذهبية. ومنذ ذلك الحين، فإن التوسيم (التمييز) للجزيئات المستهدفة، خصوصاً البروتينات، مجزيئات ذهبية قد أحدث ثورة في تصوير المكونات الخلوية أو النسيجية بالمجهر الإلكتروني. وقد وفرت نوعيات (خاصيات) تباين الشعاع الإلكتروني والبصري لغروي الذهب صفات الكشف الممتازة لمثل هذه التقنيات كصبغ مناعي immunoblotting، وقياس التدفق الخلوي flow cytometry، وفحوصات التهجين hybridization assays [8]. وتوجد بروتوكولات ترافق لتوسيم تشكيلة واسعة من الجزيئات الحيوية بغروي الذهب، مثل البروتين أ، والأفيدين، وستربتافيدين، وإنزيم أوكسيداز الجلوكوز، وإنزيم بيروكسيداز الفجل، و IgG. وقد سبق شرح كيفية نجاح ترافق الأصداف الذهبية النانوية مع الإنزيمات والأجسام المضادة [13]. وفي هذه المقالة، نقدم بيانات تعرض إمكانيات الأصداف النانوية لعدة تطبيقات طبية حيوية، بما في ذلك استخدام أصداف المترافقات الحيوية النانوية، كعلامات بيولوجية للتصوير البصري، وتطوير عوامل تباين تشتت أساسها صدف نانوية للتصوير الشعاعي المقطعي المترابط بصرياً، واستخدام أصداف الامتصاص النانوية للعلاج الحراري البصري للأورام.

١٢,٢ المنهجية Methodology

تصنيع الصدف الذهبية النانوية Gold nanoshell fabrication

تم صنع قلب جسيمات السيليكا النانوية حسب الطريقة الموصوفة من قبل ستوبر Stober وآخرين [9]، والتي تم فيها اختزال رباعي أثيل أورثو سيليكات tetraethylorthosilicate في هيدروكسيد الأمونيا NH_4OH في الإيثانول. وتم تحديد حجم الجسيمات باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح من نوع فيليبس XL30. ويُعدُّ التشتت

المتعدد بنسبة أقل من ١٠٪ مقبولاً. وبعد ذلك، تم إضافة مجموعة أمين لسطح السيليكا، بالتفاعل مع أمينوبروبيل ثلاثي إيثوكسي سيلان aminopropyltriethoxysilane في الإيثانول. وتم إخماء الأصداف الذهبية باستخدام طريقة دوف Duff وآخرين [10]. ولفترة وجيزة، تم امتزاز غروي الذهب الصغير (١-٣ نانومتر) على سطح جسيمات السيليكا النانوية الأمانية. ومن ثم اختزل المزيد من الذهب على مواقع التنوي الغروية هذه، باستخدام كربونات البوتاسيوم و HAuCl_4 ، في وجود الفورمالدهيد. وجرى تقييم تشكيل وأبعاد الصدفة الذهبية النانوية بمقياس طيف الأشعة فوق البنفسجية والمرئية، والمجهر الإلكتروني الماسح (SEM). ولقد وصفت الأصداف النانوية المستخدمة في دراسات تصوير تشتت المجال المظلم المكونة من قلب سيليكا بنصف قطر ١٢٠ نانومتر، وبصدفة ذهب بسلك ٣٥ نانومتر، تتألف من الأصداف النانوية المستخدمة في التصوير الشعاعي الطبقي المترابط بصرياً (OCT) من قلب، بنصف قطر ١٠٠ نانومتر، وصدفة بسلك ٢٠ نانومتر. ووصفت الأصداف النانوية المستعملة في تطبيقات العلاج بقلب نصف قطره ٦٠ نانومتر، وصدفة سمكها ١٠ نانومتر، والتي تمتص الضوء بقمة امتصاص في حدود ~ ٨١٥ نانومتر. ونوصي القارئ بالرجوع إلى المرجع رقم [6]؛ للحصول على مزيد من الوصف التفصيلي لطرائق تشييد الأصداف النانوية.

ترافق الجسم المضاد Antibody conjugation

لقد استخدم بوليمر البولي أثيلين جلايكول أرثو-بيريديل-ثنائي كبريتيد-n-هيدروكسي سكسيناميد (OPSSPEG-NHS، ووزنه الجزيئي = ٢٠٠٠) Ortho-pyridyl- disulfide-n-hydroxysuccinimide polyethylene glycol؛ لربط الأجسام المضادة على أسطح الأصداف الذهبية النانوية. وعن طريق استخدام بيكربونات الصوديوم NaHCO_3 (١٠٠ ملي مول، ورقم هيدروجيني pH = ٨.٥)، تم تعليق ال-OPSSPEG-

NHS إلى حجم مكافئ لذلك من الأجسام المضادة، إما إلى HER2 (نوعية)، أو IgG (غير نوعية). وفي هذا التركيز، كان تركيز البوليمر المولي زائدا عن كمية الأجسام المضادة IgG أو HER2 المستخدمة، وترك التفاعل في الثلج ليكتمل خلال الليل. ويتم إزالة البوليمر غير المرتبط الزائد بغشاء الديليزة (بمسام فصل وزن جزيئي = 10,000)، ويتم إضافة جسم مضاد مرتبط بالبولي أثيلين جلايكول (PEGylated) (0.67 ملجم مل⁻¹) إلى الأصداف النانوية (~10⁹ أصداف نانوية مل⁻¹) لمدة ساعة واحدة؛ لتسهيل الاستهداف. ويتم إزالة الأجسام المضادة غير المرتبطة بواسطة الطرد المركزي في 650 g، والإزالة الطافية، وإعادة تكوين المعلق في كربونات البوتاسيوم (٢ ملي مول). وبعد ترافق الجسم المضاد، تم تعديل أسطح الأصداف النانوية أكثر مع ثيول-PEG (١ ميكرومول، وزن جزيئي = 5000)؛ لحجب مواقع الامتصاص غير النوعية، وتحسين التوافق الحيوي.

زراعة الخلية Cell culture

كانت زراعة خلايا سرطان غدة الثدي البشري SKBR3 موجبة-HER2 في وسط معدل مكوي McCoy's 5A مستكمل بـ 10% FBS ومضادات حيوية. وتم حفظ الخلايا في درجة حرارة 37° م، وثنائي أكسيد الكربون 5%.

التصوير الجزيئي، والسمية الخلوية، وصبغ الفضة

Molecular imaging, cytotoxicity, and silver staining

تم تعريض خلايا الـ SKBR3 إلى ٨ ميكروجرام مل⁻¹ من أصداف مترافقة حيوية نانوية لمدة ساعة واحدة، وغسلها بمحلول ملحي الفوسفات الصاد، وتم مشاهدتها تحت مجهر المجال المظلم، وهو شكل من أشكال المجاهر الحساسة للضوء المشتت فقط. وتم استخدام صبغة الكلسين-AM الحويية (مسابر جزيئية، ١ ميكرومول)؛ لتقييم قابلية الحياة والنمو للخلية بعد استهداف الصدف النانوية. واستخدمت

صبغة تعزيز الفضة (أمرشام فارماسيا Amersham Pharmacia)، وهي صبغة نوعية قادرة على اكتشاف وجود الذهب على أسطح الخلية، لتقييم ترابط الصدف النانوية الخلوي. وتم تثبيت الخلايا المحضنة مع أصداف نانوية مستهدفة بـ ٢.٥٪ جلوتارالدهيد، وعرضت إلى صبغة الفضة لمدة ١٥ دقيقة. وقد تم مراقبة نمو الفضة تحت تباين الطور، مع منع مزيد من تعزيز الفضة بالغمر في ثيوكبريتات الصوديوم ٢.٥٪. والتقطت صورة صبغة الفضة والمجال المظلم بمجهر من نوع Zeiss Axioskop 2 plus ، مزود بكاميرا بجهاز مزدوج الشحنة CCD أبيض وأسود. وقد التقطت جميع الصور بتكبير ٤٠ مرة تحت ظروف الإضاءة نفسها.

التصوير الشعاعي الطبقي المترابط بصرياً (OCT) Optical coherence tomography

إن التصوير الشعاعي الطبقي المترابط بصرياً (OCT)، هو أحدث طراز من تقنيات التصوير، والذي يعطي درجة وضوح عالية الدقة (نموذجياً ١٠-١٥ ميكرومتر)، وصور مقطعية فورية خلال الأنسجة البيولوجية، وغالباً ما يتم وصف الطريقة كنظير بصري للموجات فوق الصوتية. ويكشف التصوير الشعاعي الطبقي المترابط بصرياً OCT الانعكاسات من مصدر الضوء منخفض الترابط، الموجهة إلى الأنسجة، ويُحدد عند أي عمق حدثت الانعكاسات. وباستخدام نظام كشف بصري مختلط الترددات، يكون التصوير الشعاعي الطبقي المترابط بصرياً OCT قادراً على كشف انعكاسات ضعيفة جداً، نسبة للقوة الساقطة والواصلة للنسيج. وفي مجال التصوير الشعاعي الطبقي المترابط بصرياً OCT، يتم رفض الضوء الخارج من البؤرة بقوة؛ بسبب اختيار جزء من موجة مترابطة ملازم لهذا الأسلوب. ويسمح هذا بتصوير أعمق باستخدام التصوير الشعاعي الطبقي المترابط بصرياً OCT، عما هو ممكن باستخدام الطرائق البديلة، مثل المجهر متحد بؤرة الانعكاس، حيث تحقيق رفض الضوء الخارج من البؤرة، يكون أقل بكثير. ويعتمد عمق التصوير الشعاعي الطبقي

المترايط بصرياً OCT على نوع النسيج، ولكن عادة ما يصل إلى عدة ملليمترات. وفي تجارب التصوير الشعاعي الطبقي المترايط بصرياً OCT، الموصوفة في هذا البحث، استُخدم نظام التصوير الشعاعي الطبقي المترايط بصرياً OCT التقليدي بديود فائق الإضاءة ٨٣٠ نانومتر؛ للحصول على مسح-m لوعاء العينة أو للكوفيت (صور مع الزمن كمحور-x، والعمق كمحور-y). ودرجة الوضوح المحورية والجانبية من نظام التصوير الشعاعي الطبقي المترايط بصرياً OCT، كانت ١٦ ميكرومتر، و ١٢ ميكرومتر على التوالي. وتطلبت كل صورة حوالي ٢٠ ثانية حتى يتم التقاطها، وظلت بارامترات النظام دون تغيير في كافة مراحل التجربة.

العلاج الحراري الضوئي بالصدفة النانوية خارج الجسم

In vitro photothermal nanoshell therapy

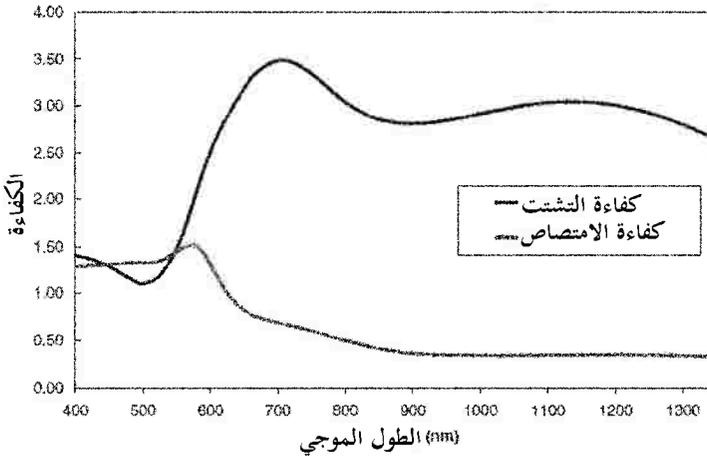
تم زراعة خلايا سرطان الثدي SKBR3 في أطباق جيدة-٢٤، حتى دُمجت تماماً، ثم قُسمت الخلايا إلى مجموعتي معالجة، وهما: المعالجة بأصداف نانوية + ليزر الأشعة تحت الحمراء القريبة، والليزر بمفرده. وتم تعريض الخلايا إلى أصداف نانوية بمفردها، أو خلايا لا تستقبل الأصداف النانوية ولا الليزر، استخدمت كمتحكيمات في النمو. وتم تحضير أصداف نانوية في وسط خالٍ من الـ FBS (٢×١٠^٩ أصداف نانوية مل^{-١}). وبعد ذلك شُعبت الخلايا تحت ضوء انبعاث الليزر عند ٨٢٠ نانومتر، بشدة طاقة حوالي ~ ٣٥ وات سم^{-٢} لمدة ٧ دقائق، مع الأصداف النانوية أو بدونها. وبعد التعرض لضوء الأشعة تحت الحمراء القريبة NIR، زودت الخلايا بأوساط تحتوي على الـ FBS، وتم تحضينها لمدة ساعة إضافية في درجة حرارة ٣٧°م. ومن ثم عرضت الخلايا لصبغة الكلسين-AM الحيوية، لمدة ٤٥ دقيقة من أجل قياس قابلية الحياة والنمو للخلية، وتسبب صبغة الكلسين خلايا فعالة للتألق الأخضر. وتم تصوير التألق (التفلور) بواسطة مجهر تفلور من نوع Axiovert Zeiss Axiovert 135، مجهزة بمجموعة

مرشحات محددة لأطوال موجات الإثارة والانبعاث عند ٤٨٠ و ٥٣٥ نانومتر، على الترتيب. وقِيم التلف الغشائي باستخدام صبغة دكستران فلوريسين الألدheid القابلة للتثبيت، وتم تحضين الخلايا لمدة ٣٠ دقيقة مع دكستران الفلوريسنت، ثم شطفها وتثبيتها على الفور بجلوتارالدهيد ٥٪. ويعزى التدمير الحراري البصري للخلايا إلى الحرارة المفرطة المستحثة عن طريق امتصاص الصدفة النانوية لضوء الأشعة تحت الحمراء القريبة.

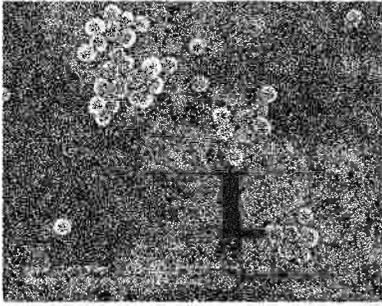
١٢,٣ النتائج والمناقشة Results and Discussion

كاستعراض أولي لإمكانات الأصداف النانوية في تصوير السرطان والعلاج، لقد صممنا وصنعنا أصدافا نانوية مناسبة لكل من التطبيقات الفوتونية المستندة على الامتصاص والتشتت. ولإثبات صحة دراسات التصوير من حيث المبدأ، صنعنا أصدافا نانوية بنصف قطر ١٢٠ نانومتر، وسمك صدفة ٣٥ نانومتر. كما تجدر الإشارة إلى أنه يمكن صنع أصداف نانوية على مدى واسع من الحجم؛ لتطبيقات التصوير المستند على التشتت. ويعرض الشكل رقم (١٢,٦) أطيف الامتصاص والتشتت المتوقعة من هذه الأصداف النانوية المتحصل عليها، باستخدام برمجيات تؤكد صحتها على نطاق واسع ضد نظرية مي، التي تحسب الأطيف البصرية عددياً لأصداف الذهب النانوية. كما يوضح الشكل رقم (١٢,٦) أن هذه الأصداف النانوية تُشتت الضوء بقوة في كافة أنحاء مناطق الأشعة تحت الحمراء القريبة والمرئية. ويسمح هذا بأن تُستعمل الأصداف النانوية نفسها في دراسات المجهر المستند على الضوء، والتي تستخدم الكاميرات بجهاز مزدوج الشحنة CCDs السيلكون، وفي دراسات تصوير النسيج بالأشعة تحت الحمراء القريبة NIR، باستخدام مجهر متحد بؤرة الانعكاس والتصوير الشعاعي الطبقي المترابط بصرياً OCT. كما صنعنا أصدافا نانوية بنصف قطر

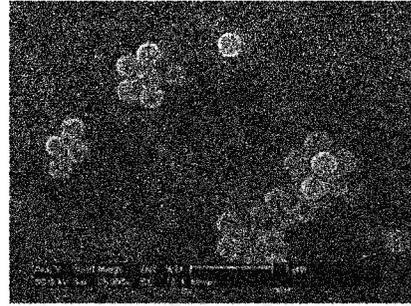
١٠٠ نانومتر، وسمك الصدفية ٢٠ نانومتر؛ للتصوير الشعاعي الطبقي المترابط بصرياً OCT. ولهذه الأصداف النانوية أطيايف امتصاص وتشتت مشابهة بصورة كبيرة للأصداف النانوية الأكبر، ومع ذلك، تكون مقاطع الامتصاص والتشتت العرضية أصغر، ويعود ذلك بشكل كبير إلى حجم الجسيمات الأصغر. وبالإضافة إلى ذلك، صُنعت أصداف نانوية بنصف قطر أصغر من ٦٠ نانومتر، وسمك صدفية ١٠ نانومتر؛ لتطبيقات العلاج الحراري الضوئي. ويعرض الشكل الرقم (١٢،٧) صور المجهر الإلكتروني الماسح SEM لأصداف نانوية مصنعة في كل الحجم الثلاث.



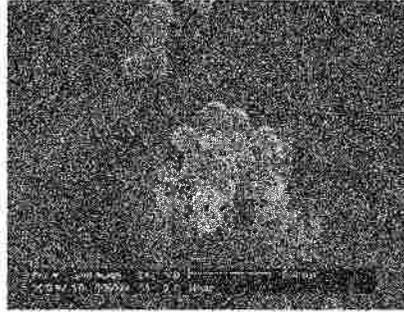
الشكل رقم (١٢،٦). خواص الامتصاص والتشتت لأصداف نانوية بقلب سيليكاً نصف قطره ١٢٠ نانومتر، وصدفية ذهبية بسمك ٣٥ نانومتر، والمتوقعة تحليلياً. أقصى تشتت (٧٠٥-٧١٠ نانومتر)، يكون أكبر بمرتين ونصف من حد الامتصاص الأقصى (٥٧٠ نانومتر)، ويمتد إلى منطقة الأشعة تحت الحمراء القريبة NIR. وقد قيمت أبعاد الصدفية النانوية باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح (SEM). وأثبت رياضياً سمك الصدفية بمطابقة القياسات التجريبية إلى نظرية التشتت، وأكّدت بالمجهر الإلكتروني الماسح SEM.



(ب)



(أ)

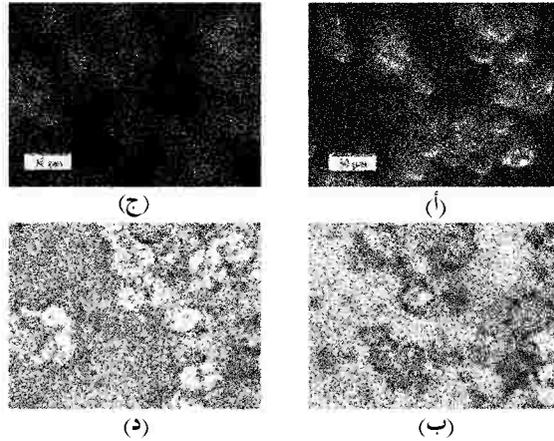


(ج)

الشكل رقم (١٢,٧). صور المجهر الإلكتروني الماسح لأصداف نانوية مستخدمة في الدراسات الموصوفة. (أ) الأصداف النانوية ذات القطر الأكبر المستخدمة في تجارب تصوير المجال المظلم. (ب) الأصداف النانوية المستخدمة في تجارب التصوير الشعاعي الطبقي المترابط بصرياً OCT. (ج) الأصداف النانوية ذات القطر الأصغر المستخدمة في تطبيقات العلاج الحراري الضوئي. شريط المقياس في (أ) و (ب) ١ ميكرومتر بينما شريط المقياس في (ج) هو ٥٠٠ نانومتر.

كاستعراض أولي لإمكانية التصوير الجزيئي لمرافقات الصدفة النانوية الحيوي، صورنا خلايا السرطان التي تنتج الـ HER2 بكثرة، وهي دليل جزيئي مهم سريرياً لسرطان الثدي. وتحت مجهر المجال المظلم - شكل من أشكال المجهر الحساس فقط للضوء المشتت - حدثت زيادة كبيرة في التباين البصري نتيجة لتعديل الـ HER2 الملاحظ في خلايا سرطان الثدي SKBR3 موجبة الـ HER2 - المستهدفة بأصداف نانوية

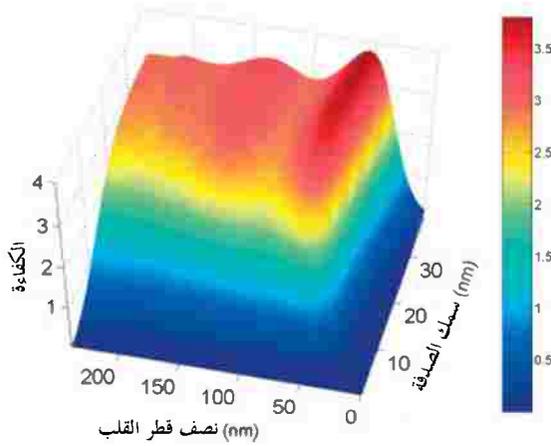
موسومة بـ HER2 ، مقارنة إلى الخلايا المستهدفة بأصداف نانوية مسومة بشكل غير محدد بـ IgG (الشكل رقم ١٢,٨). وبالإضافة إلى ذلك ، تم رؤية كثافة صبغ الفضة أكبر في الخلايا المعرضة لأصداف نانوية مستهدفة -HER2 عن الخلايا المعرضة لأصداف نانوية مستهدفة الـ IgG ؛ مما يوفر دليلاً إضافياً على أن التباين المتزايد الملاحظ تحت المجال المظلم ، يمكن أن ينسب بشكل محدد إلى استهداف الأصداف النانوية لمستقبل الـ HER2. ولم يتم رصد أي اختلافات تحت المجال المظلم ، أو صبغة الفضة في الـ HER2 ، وأصداف نانوية مستهدفة الـ IgG ، باستخدام بطانة خلية سرطان الثدي MCF7 سالبة الـ HER2 (البيانات ليست معروضة). وأوصاف أكثر شمولاً لتجارب التصوير باستخدام مترافقات الصدف النانوية الحيوية الموصوفة في المرجع رقم [11].



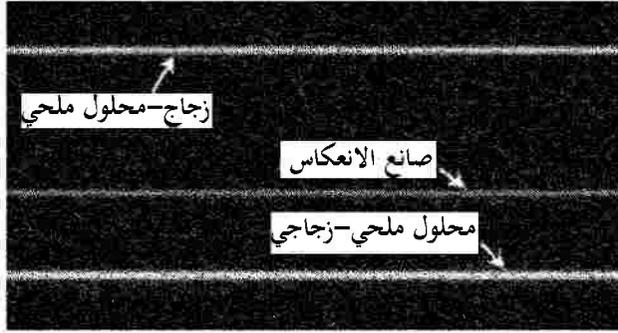
الشكل رقم (١٢,٨). صور المجال المظلم (أ، ج) وصبغ الفضة (ب، د) لخلايا سرطان الثدي SKBR3- موجب الـ HER2 ، عرضت لأصداف نانوية مترافقة، إما مع أجسام مضادة (نوعية) -HER2 (أ، ب) أو (لا نوعية) -IgG (ج، د). وكما هو معروض هنا، من الممكن استغلال الخواص البصرية لأصداف نانوية متشتمة والممثلة على الصورة الـ HER2 ، المنتج بكثرة في الخلايا الحية. وقد لوحظت شدة تشتت مماثلة عند مقارنة خلايا تعرضت لأصداف نانوية مستهدفة الـ IgG ، وخلايا لم تتعرض لمترافقات أصداف نانوية حيوية.

وعلى الرغم من أن مجهر المجال المظلم مناسب لتجارب التصوير على مستوى الخلية خارج الجسم، إلا أن تطبيقات التصوير داخل الجسم، ستتطلب استخدام تقنيات التصوير المناسبة المستندة على التشتت، مثل التصوير الشعاعي الطبقي المترابط بصرياً OCT. ولتقييم مدى ملاءمة الأصداف النانوية لتطبيقات التصوير الشعاعي الطبقي المترابط بصرياً OCT، حسبنا كفاءات التشتت للأصداف الذهبية النانوية (في محلول ملحي)، على مدى من أنصاف أقطار القلب، وسمك الصدفية عند ٨٣٠ نانومتر، كما هو مبين في الشكل رقم (١٢،٩). وتم حساب مقاطع التشتت العرضية الواعدة (تقريباً عدة مرات من المقاطع الهندسية العرضية) لأصداف نانوية، استناداً على البارامترات الفيزيائية التي يمكن أن تصنع بسهولة دراسة تجريبية أخرى مُشجعة. ولتوفير قاعدة لمقارنة كفاءات التشتت، فإن كفاءة التشتت لكرة بولي سترين، بقطر ١٥٠ نانومتر في محلول ملحي عند ٨٣٠ نانومتر، تكون ٠,٠٠٩؛ أما كفاءة التشتت بالنسبة لكرة بولي سترين بقطر ٣٠٠ نانومتر، تكون ٠,٠٩. كدليل مرئي لإمكانات الأصداف النانوية لتطبيقات التصوير الشعاعي الطبقي المترابط بصرياً OCT. وقد صورنا كوفيت (وعاء عينة)، بمسار طوله ١ ملم، وتحتوي على أحد المحاليل الثلاثة: الملحي، ومحلول تشتت أساسه كرات دقيقة، أو محلول لأصداف تشتت نانوية في الماء (الشكل رقم ١٢،١٠). وكان خليط الكرات الدقيقة ٠,١٪ مواد صلبة بالحجم من كرات بولي سترين ٢ ميكرومتر في محلول ملحي عند التركيز، الذي يوفر معامل التشتت $\mu_s = 16 \text{ سم}^{-1}$ ، وعامل تباين الخواص anisotropy $g = 0.96$. وكان تركيز الصدفية النانوية (نصف قطرها ١٠٠ نانومتر، وسمك الصدفية ٢٠ نانومتر) تقريباً 10^9 مل^{-1} . ويعرض الشكل رقم (١٢،١٠) صور التصوير الشعاعي الطبقي المترابط بصرياً OCT للكوفيت بالكرات الدقيقة والأصداف النانوية الملحية. وتتكون الصور من ١٠٠ مسح في الموقع الجانبي نفسه. وتم حساب قيمة التدرج الرمادي grayscale المتوسطة داخل

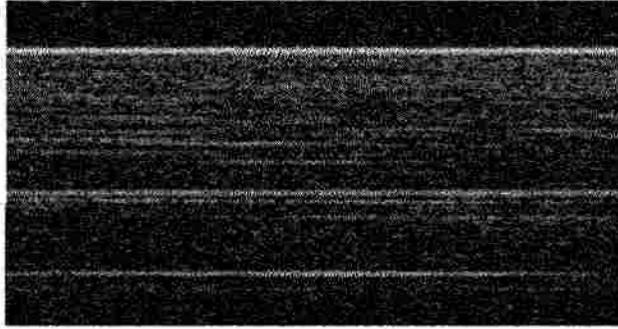
جدران الكوفيت، باستخدام برنامج تحليل صورة المعهد القومي للصحة. وتستند كثافة التصوير الشعاعي الطبقي المترابط بصرياً OCT على مقياس السجل، حيث الأسود (٢٥٥) يقابل حداً أدنى من الضجيج -١٠٠ ديسيبيل والأبيض (٠) إلى -٤٠ ديسيبيل. ولتوفير مقارنة تقريبية للشدة المشتتة المقاسة، كانت شدة التدرج الرمادي المتوسطة للمحلول الملحي ٢٤٧، بينما كانت الشدة المتوسطة داخل جدران الكوفيت المحتوي على أصداغ نانوية، هي ١٦٠. والعمل الحالي يستكشف بعناية أكثر إمكانيات الأصداغ النانوية كعوامل تباين للتصوير الشعاعي الطبقي المترابط بصرياً OCT، خلال دراسات التصوير داخل الجسم للفئران، بعد الحقن المباشر بأصداغ التشتت النانوية في الأوعية الدموية عن طريق قسطرة وريد الذيل [12].



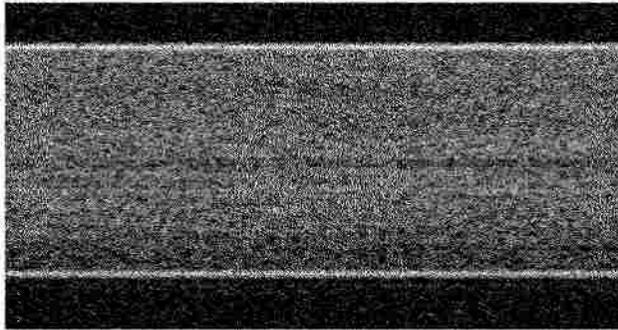
الشكل رقم (٩، ١٢). كفاءة تشتت محسوبة لأصداغ نانوية، كدالة في نصف قطر القلب، وسمك الصدفة عند ٨٣٠ نانومتر، وطول موجي مستخدم عموماً في تطبيقات التصوير الشعاعي الطبقي المترابط بصرياً.



(أ)



(ب)

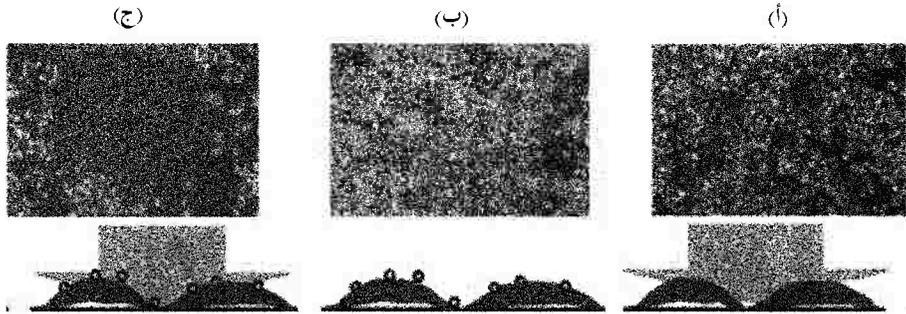


(ج)

الشكل رقم (١٠، ١٢). صور التصوير الشعاعي الطبقي المترابط بصرياً OCT (٨٣٠ نانومتر) لكوفيت مليئة بمحلول ملحي (أ)، وكوفيت تحتوي على كرات دقيقة لتقريب معامل التشتت لـ ١٦ سم^{-١} (ب)، وكوفيت تحتوي أصدافا نانوية في تركيز ~١٠٠ مل^{-١} (ج).

وسيتم توجيه الجهود في المستقبل نحو إقران تقنيات التصوير الجزيئي، والذي يكون أساسه الصدفة مع شكل من أشكال التدخل العلاجي القابل للتنفيذ. وقد أعدت الدراسات الحديثة أسلوباً جديداً لعلاج السرطان، يستند على استخدام أصداف الفلز النانوية، كماصات للأشعة تحت الحمراء القريبة NIR [13]. وفي النسيج البيولوجي، تكون نفاذية النسيج أعلى في المدى الطيفي للأشعة تحت الحمراء القريبة NIR؛ بسبب انخفاض التشتت المتأصل، وخواص الامتصاص ضمن المنطقة. ويبرهن الشكل رقم (١٢.٦) على أنه يمكن تطوير الأصداف النانوية للوصول إلى تشتت أعلى ضمن هذه المنطقة الطيفية، وبدلاً من ذلك، يمكن أن تُهندس الأصداف النانوية لتعمل كماصات للأشعة تحت الحمراء القريبة NIR الفعالة جداً أيضاً. وكمثال على الامتصاص الكثيف (الحاد)، الممكن باستخدام الأصداف النانوية، فصبغة أخضر الأندوسيانين indocyanine لها مقطع امتصاص عرضي للأشعة تحت الحمراء القريبة NIR من 10^{-10} م^٢ عند $800 \sim$ نانومتر، بينما المقطع العرضي للأصداف النانوية الماصة الموصوفة في هذه المقالة، هو $4 \sim 10 \times 10^{-14}$ م^٢، أي بزيادة مليون مرة تقريباً في مقطع الامتصاص العرضي [13]. ومن خلال دمج الأصداف النانوية الماصة للأشعة تحت الحمراء القريبة NIR مع مصدر الضوء المناسب؛ يكون من الممكن حث التدمير الحراري الضوئي انتقائياً للخلايا، والأورام التي تمت معالجتها بأصداف الذهب النانوية. إن التدمير الحراري الضوئي لصدفة نانوية وسيطة لخلايا السرطان موصوف في الشكل رقم (١٢.١١). وبعد تعريض الليزر بقوة ٣٥ وات سم^{-٢} لمدة ٧ دقائق، خضعت كل الخلايا ضمن موضع الليزر للتدمير الحراري الضوئي، كما تم تقييم استخدام صبغ حيوي الكلسين-AM، ولم يلاحظ هذا التأثير في الخلايا التي عرضت، إما لأصداف نانوية بمفردها، أو لضوء الأشعة تحت الحمراء القريبة NMR بمفردها. وبالإضافة إلى ذلك، لوحظ دليل على تلف غشاء الخلية غير العكسي، في الخلايا

الواقعة ضمن بقعة الليزر، وذلك عن طريق تصوير صبغة الدكستران الفلورية (البيانات غير معروضة)، ولا تنفذ هذه الصبغة عادة إلى الخلايا السليمة. واكتشفت الصبغة في الفضاء الخلوي للخلايا المعرضة لكل من أصداف نانوية الأشعة تحت الحمراء القريبة NIR والليزر معاً، ولكن لم يلاحظ هذا التأثير في الخلايا التي عرضت، إما لأصداف نانوية بمفردها، وإما لضوء الأشعة تحت الحمراء القريبة NMR أو لليزر بمفردها. ويمكن استخدام صبغة الكلسين AM، وصبغة الدكستران الفلورية؛ للدلالة على أن الخلايا غير فعالة، وأن تلف الغشاء قد حدث، ولكن لا تحدد السبب الكامن وراء موت الخلية.



الشكل رقم (١١، ١٢). صبغ كلسين AM للخلايا (بدل الفلور الأخضر على الحيوية الخلوية). (أ) الخلايا بعد التعرض لليزر فقط (بدون أصداف نانوية). (ب) خلايا حضنت بأصداف نانوية خلايا النانو، ولكن لم تعرض لضوء الليزر. (ج) خلية حضنت بأصداف نانوية بعد التعرض لليزر. الدائرة المظلمة المشاهدة في (ج) تناظر المنطقة الميتة من الخلية الناجمة عن التعرض لضوء الليزر بعد الحضنة بالأصداف النانوية.

وفي الدراسة المنفذة على الحيوانات المذكورة في المرجع [13]، تم حقن الأصداف النانوية الماصة (١٠ مل^{-١}، ٢٠-٥٠ ميكرو لتر) بشكل خلالي (~ ٥ ملم) في الأورام الصلبة (~ ١ سم) في أنثى فئران ال-SCID. وفي غضون ٣٠ دقيقة من الحقن،

تم تعريض مواقع الورم لضوء الأشعة تحت الحمراء القريبة NIR (٨٢٠ نانومتر، ٤ وات سم^{-٢}، قطر البقعة ٥ مم، ولمدة أقل من ٦ دقائق). وتم مراقبة درجات الحرارة عن طريق التصوير بالرنين المغناطيسي MRI لصدى الخدار المرحلة الثالثة والمرحلة الحساسة. وأظهر تصوير درجة حرارة الرنين المغناطيسي (MRTI)، أن الأورام قد وصلت لدرجات الحرارة التي سببت تلف الورم غير العكسي ($\Delta T = 34.4 \pm 6.6^\circ\text{C}$) في غضون من ٤-٦ دقائق. وقد واجهت التنظيمات التي عرضت لحقن ملحي، بدلاً من الأصداف النانوية درجات حرارة متوسطة منخفضة جداً، وذلك بعد التعرض لنفس مستويات ضوء الأشعة تحت الحمراء القريبة ($\Delta T = 10^\circ\text{C}$). وتم الحصول على درجات الحرارة المتوسطة هذه على عمق ~ ٢,٥ ملم، تحت سطح الجلد. وأظهرت نتائج تصوير درجة حرارة الرنين المغناطيسي MRTI توافقاً جيداً مع مؤشرات الباثولوجيا (علم الأمراض) الإجمالية من تلف النسيج. وتم ملاحظة مؤشرات نسيجية (هستولوجية) من التلف الحراري، بما في ذلك التخرثر، وتقلص الخلايا، وفقدان الصبغ النووي في الأورام المعالجة بالصدفة النانوية؛ ولا توجد مثل هذه التغييرات في النسيج المراقب. وقدّم صبغ تعزيز الفضة دليلاً آخر من الأصداف النانوية في المناطق بالتلف الحراري.

ووصف العمل الأولي هنا الصدفة النانوية المؤسسة، وجرعات الليزر التي وفرت العلاج الحراري الضوئي لوسيط الصدفة النانوية الفعال. واستناداً على البارامترات المعرفة خلال هذه التحقيقات الأولية، تجرى الآن دراسات البقاء على قيد الحياة. وسيعيد العمل المستقبلي الأصداف النانوية المترافقة إلى علامات السطح المنتجة داخل الأورام بكثرة.

١٢,٤ الاستنتاجات Conclusions

يُوفر الجمع بين التقدم في الفوتونيات الحيوية وتقنية النانو الفرصة لدفع الإستراتيجيات المستقبلية بشكل كبير نحو الكشف وعلاج السرطان. واليوم يتم

تشخيص السرطان عادة بعد نموه بسنوات عديدة، أما بعد اكتشاف كتلة واضحة عادة أو على أساس تصوير منخفض الوضوح نسبياً للكتلة الأصغر، ولكن تظل الكتل مهمة. وفي المستقبل، يكون من المرجح أن تستهدف عوامل التباين العلامات الجزيئية من المرض؛ لتوفر بشكل روتيني المعلومات الجزيئية القادرة على توصيف القابلية للمرض قبل فترة طويلة من حدوث التغيرات الباثولوجية على المستوى التشريحي. وحالياً تكون قدرتنا على تطوير عوامل التباين الجزيئية محدودة أحياناً بالقصور في فهمنا للمؤشرات الجزيئية المبكرة من أمراض سرطان معينة. وعلى الرغم من أن عملية تمييز الأهداف المناسبة للكشف والعلاج مازالت جارية، إلا أن هناك حاجة قوية لتطوير التقنيات، التي تتيح لنا تصوير هذه الأهداف الجزيئية داخل الجسم الحي وتوضيحها. وفي هذه المقالة، وصفنا الخواص البصرية، والعديد من التطبيقات السريرية الناشئة من الأصداف النانوية، وفئة واحدة من التراكيب النانوية، التي قد تقدم مرشحاً جذاباً للتصوير النوعي داخل الجسم وتطبيقات العلاج. ولقد استعرضنا عملنا الأولي الموجه لتطوير مترافقات الصدف النانوية الحيوية لتطبيقات التصوير الجزيئي، ووصفنا أسلوباً جديداً مهماً لعلاج السرطان الحراري الضوئي. ويجري حالياً المزيد من الدراسات الشاملة داخل جسم الحيوانات لكل من تصوير السرطان، وتطبيقات العلاج من أجل فحص أكثر شمولاً لكل من حدود وإمكانيات تقنيات الصدف النانوية. والدراسات الإضافية مستمرة لتقييم أكثر دقة للتوزيع الحيوي، والتوافق الحيوي للأصداف النانوية المستخدمة في التصوير داخل الجسم، وتطبيقات العلاج. ونعتقد أن هناك إمكانية هائلة للتآزر بين المجالات المتطورة سريعاً من الفوتونيات الحيوية وتقنية النانو. وقد يوفر الجمع بين الأدوات من كلا الحقلين - سوياً مع أحدث التطورات في فهم الأصول الجزيئية للسرطان - أسلوباً جديداً تماماً لاكتشاف السرطان وعلاجه، حيث إن هذا المرض أصبح مسؤولاً عن أكثر من رُبع الوفيات في الولايات المتحدة اليوم.

شكر وتقدير Acknowledgments

لقد تم تمويل هذا المشروع من قبل المؤسسة القومية للعلوم (BES 022-1544)، ومركز تقنية النانو البيولوجية والبيئية بالمؤسسة القومية للعلوم (EEC-0118007)، وبرنامج البحوث الطبية الموجه من الكونغرس بوزارة الدفاع (DAMD17-03-1-0384).

المراجع References

- 1 Sokolov, K., Follen, M., Aaron, J., Pavlova, I., Malpica, A., Lotan, R., Richards-Kortum, R., Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles. *Cancer Res.* 2003, 63, 1999–2004.
- 2 Bruchez, M., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S., Alivisatos, A. P., Semiconductor labels as fluorescent biological labels. *Science* 1998, 281, 2013–2016.
- 3 Chan, W. C. W., Nie, S., Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science* 1998, 281, 2016–2018.
- 4 Akerman, M. E., Chan, W., Laakkonen, P., Bhatia, S. N., Ruoslahti, E., Nanocrystal targeting in vivo. *PNAS* 2002, 99, 12617–12621.
- 5 Brongersma, M. L., Nanoshells: gifts in a gold wrapper. *Nat. Mater.* 2003, 2, 296–297.
- 6 Oldenburg, S. J., Averitt, R. D., Westcott, S. L., Halas, N. J., Nanoengineering of optical resonances. *Chem. Phys. Lett* 1998, 288, 243–247.
- 7 Averitt R. D., Sarkar D., Halas N. J., Plasmon resonance shifts of Au-coated Au₂S nano-shells: insights into multicomponent nanoparticles growth. *Phys. Rev. Lett* 1997, 78, 4217–4220.
- 8 Faulk, W. T., Taylor G., An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry* 1971, 8, 1081–1083.
- 9 Stober, W., Fink, A., Bohn, E., Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* 1968, 26, 62–69.
- 10 Duff, D. G., Baiker, A., Edwards, P. P., A new hydrosol of gold clusters. 1. Formation and particle size variation. *Langmuir* 1993, 9, 2301–2309.
- 11 Loo, C. H., Hirsch, L. R., West, J. L., Halas, N. J., Drezek, R. A. Molecular imaging in living cells using nanoshell bioconjugates. *Optics Letters* 2004 (in review).
- 12 Barton, J., Romanowski, M., Halas, N., Drezek, R., Nano-shells as an OCT contrast agent. *Proc SPIE* 5316, 2004 (in press).
- 13 Hirsch, L. R., Stafford, R. J., Bankson, J. A., Sershen, S. R., Rivera, B., Price, R. E., Hazle, J. D., Halas, N. J., West, J. L., Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *PNAS* 2003, 100, 13549–13554.

- 14 Cerussi, A. E., Jakubowski, D., Shah, N., et al., Spectroscopy enhances the information content of optical mammography. *J. Biomed. Optics* 2002, 7, 60–71.
- 15 Ntziachristos, V., Chance, B., Probing physiology and molecular function using optical imaging: applications to breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2001, 3, 41–46.
- 16 Shah, N., Cerussi, A., Eker, C., et al., Noninvasive functional optical spectroscopy of human breast tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2001, 98, 4420–4425.
- 17 Tromberg, B. J., Shah, N., Lanning, R., et al., Non-invasive in vivo characterization of breast tumors using photon migration spectroscopy. *Necplasia* 2000, 2, 26–40.
- 18 Richards-Kortum, R., Sevick-Muraca, E., Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 1996, 47, 555–606.