

تقنيات النانو للتصوير الخلوي والجزيئي

بالرنين المغناطيسي

Nanotechnologies for Cellular and Molecular Imaging by MRI

باتريك م. وينتر، وشيلتون د. كارثرز، وصموئيل أ. ويكلين، وغريغوري م. لانزا
Patrick M. Winter, Shelton D. Caruthers, Samuel A. Wickline, and Gregory M. Lanza

٩,١ المقدمة Introduction

إن التطورات في مجال علم الأحياء الخلوي والجزيئي، تُوسع آفاق التصوير الطبي من مجرد الوصف التشريحي الإجمالي (العام)، إلى تصوير عمليات الإشارة الخلوية والكيميائية الحيوية. كما تهدف المجالات الناشئة من التصوير الخلوي والجزيئي إلى تشخيص الأمراض غير المتفشية، على أساس الكشف داخل الجسم، والتوصيف للعمليات الباثولوجية (المرضية) المعقدة، مثل حث الالتهابات أو نشوء (تكوّن) الأوعية الدموية الجديدة angiogenesis. وقد تم مؤخراً تطوير التقنيات لتحقيق تصوير جزيئي و خلوي باستخدام معظم طرائق التصوير، بما في ذلك التصوير النووي [1, 2]، والبصري [2, 3]، وبالموجات فوق الصوتية [4]، والتصوير بالرنين المغناطيسي MRI [5,6]. ويركز هذا الفصل على تقنيتين تم تطويرهما للكشف عن تصلب الشرايين،

بواسطة التصوير بالرنين المغناطيسي MRI: التصوير الخلوي للخلايا البلعمية الكبيرة (أو لخلايا الدم البيضاء)، المرتبطة بآفات (مجروح) التهابية، والتصوير الجزيئي لنشوء الأوعية الدموية المستحث في لويحات (تجمعات) plaques الأوعية الدموية النامية. وسيتم مناقشة اختيار طرائق التصوير، وصياغة عامل التباين، بالإضافة إلى الاستفادة المثلى من هذه التقنيات للتصوير الجزيئي والخلوي الناجح داخل الجسم.

ونظراً لأن الخلايا الفردية والجزيئات الكيميائية الحيوية صغيرة جداً، وحتى يمكن تصويرها مباشرة باستخدام تقنيات غير منتشرة، فإننا نحتاج إلى عوامل تباين مستهدفة لمواقع محددة وحساسة؛ لتصوير الحواتم (مفردها حاتمة: الجزء المستضد الذي يتم التعرف عليه بواسطة الجهاز المناعي) epitopes المهمة. ومن الناحية التاريخية، هيمن التصوير النووي على مجالات التصوير الجزيئي والخلوي؛ بسبب الحساسية العالية جداً، والبساطة النسبية لإرفاق علامات توسيم مشعة على الجزيئات الكيميائية الحيوية. وعلى سبيل المثال، يمكن تصوير نشاط الفلورودوكسي جلوكوز (FDG) - fluorodeoxy-glucose، باستخدام مساحات التصوير المقطعي بالانبعاث البوزتروني (PET scanner)؛ لتمييز مثل هذه الأمراض المتنوعة، مثل مرض ورم الأبيض [7]، والاضطرابات العقلية [8]. كذلك تم تطوير نظائر السوماتوستاتين somatostatin المرقومة بمادة مشعة للسماح بتصوير المستقبلات، للكشف عن أورام الغدد الصماء العصبية [9]. وبالإضافة إلى ذلك، فيمكن الكشف عن موت الخلايا المبرمج الخلوي باستخدام أنيكسين-7 مرقوم بالتكنيسيوم، والذي يرتبط بسيرين الفسفاتيديل phosphatidyl serine الموجود على سطح الخلايا الميتة [10]. كما صممت عوامل التصوير النووي للكشف عن تعداء (تعداء: عملية إدخال الحمض النووي في الخلية عن طريق إحداث ثقب في الغشاء البلازمي) transfection الجين، عن طريق تصوير المنتجات البروتينية الناتجة [11].

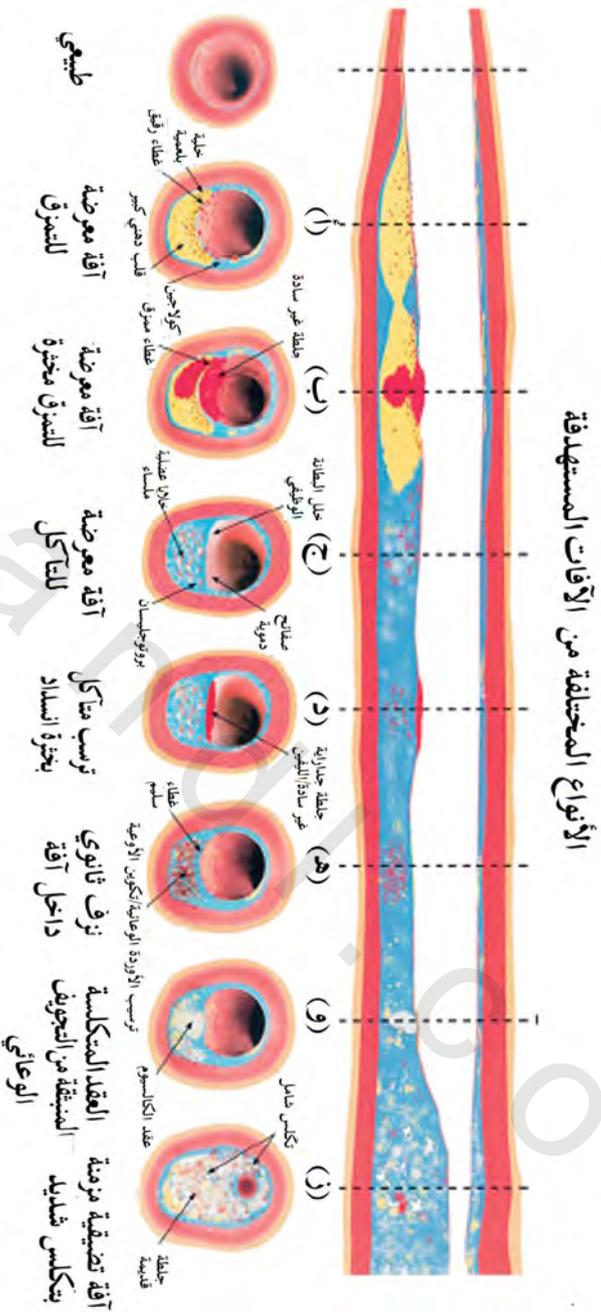
بينما ساد التصوير النووي في مرحلة التطوير المبكر للتصوير الخلوي والجزيئي، فإن طرائق أخرى، مثل التصوير البصري، والتصوير بالرنين المغناطيسي، والتصوير بالموجات فوق الصوتية، قد استخدمت للاستفادة من زيادة درجة الوضوح، ونسبة الإشارة إلى الضوضاء، والتباين المرتبط بهذه التقنيات. وعلى أية حال، فإن الحساسية المنخفضة أصلاً لهذه الطرائق، تستلزم استخدام عوامل تصوير مستهدفة معقدة في أغلب الأحيان؛ من أجل دمج إشارة كافية لتوليد الصور أو الأشكال. وعلى سبيل المثال، كانت جسيمات البيرفلوروكربون النانوية المستهدفة perfluorocarbon أول عامل تصوير جزيئي أعلن عنه لتطبيقات الموجات فوق الصوتية، يمكنه زيادة انعكاسية الجلطات thrombi بشكل كبير [12-14]. وقد تم تطوير الكثير من عوامل التباين الصوتية الأخرى لتطبيقات استهداف مماثلة، مثل بروتينات الأنتجرين الغشائية endothelial integrins، وعامل الأنسجة والتجلط [15-21].

لقد نشأ التصوير بالرنين المغناطيسي، كطريقة مفيدة للتصوير الجزيئي والخلوي، تعطي الدقة المكانية العالية، والفرصة لاستخراج كل من المعلومات التشريحية والفسيولوجية بشكل آني [22, 23]. وتتكون أغلبية عوامل التصوير بالرنين المغناطيسي المستهدفة من جسيمات نانوية، من أجل حمل كميات كافية من المواد البارامغناطيسية، أو فائقة البارامغناطيسية للتصوير داخل الجسم [24]. كما يجري حالياً- في أمراض الأوعية القلبية- تطوير عوامل تباين مستهدفة جديدة للكشف عن الآفات غير المستقرة، من خلال تحديد الفيبرين المترسب داخل شقوق لويحات دقيقة [25-28]، والتصاق الجزيئات المستخلصة أو تحترها على بطانة اللويحات الضعيفة [15, 16, 29-31]، وإنزيمات تحلل البروتينات الفلزية أو البروتينيز الفلزي metalloproteinases المصفوفة في قلب الآفات المتقدمة [32]، أو تنمية لويحة (أي توسيع أوعية العروق) داعمة النشاط الوعائي [33].

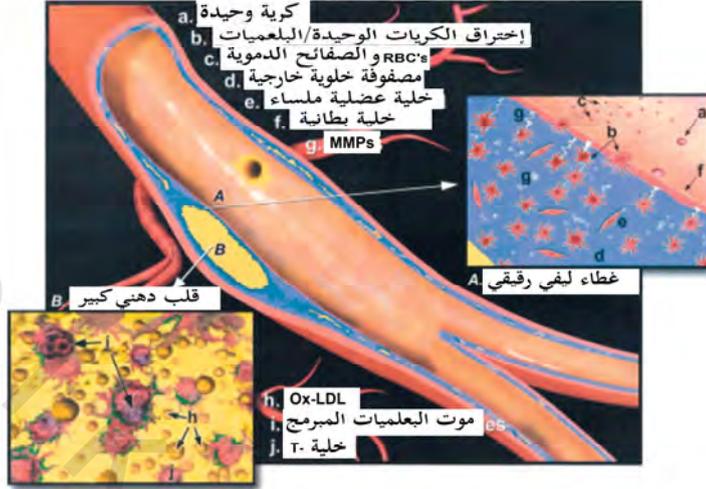
٩,٢ أمراض الأوعية القلبية Cardiovascular Disease

إن تصلب الشرايين مرض مثل العديد من الأمراض المزمنة التي تصيب الإنسان، مثل السرطان ومرض السكري، ولكنه يتطور ببطء على مدى سنوات عديدة. ومع ذلك وخلافاً لمعظم الأمراض الأخرى، فلا يتم تشخيص مرض تصلب الشرايين في أغلب الأحيان إلا بعد حدوث الحالة المزمنة أو القاتلة منه. ويصل عدد حالات الوفيات القلبية في الولايات المتحدة الأمريكية إلى ٧٢٠٠٠٠٠ حالة وفاة سنوياً، وحوالي ٦٠٪ من حالات الوفاة، تكون "وفاة مفاجئة" "sudden deaths"، تحدث بدون أي إنذار مرضي سابق [34]. ويبدأ تصلب الشرايين بآفات "كشريط دهني" "fatty streak" في الرحم (في مرحلة الأجنة) [35]، ويمكن أن تنتج لويحات عرضة للتمزق قبل سن المراهقة المبكر [36]. وقد يؤدي تمزق لويحات تصلب الشرايين غير مستقرة إلى تجلط الدم، وانسداد الأوعية الدموية، واحتشاء عضلة القلب لاحقاً أو السكتة الدماغية [37-39].

تنمو لويحات تصلب الشرايين في مراحل منفصلة، تشمل نوبات متكررة من التمزق، وتختثر الدم، والالتئام healing (الشكل رقم ٩,١) [40]؛ مما يؤدي حتماً إلى حدث نهائي، يسبب انسداد الأوعية الدموية بالكامل [41]. وتعرف "اللويحات الضعيفة" على أنها آفة تُظهر الخواص الكيميائية الحيوية والفيزيائية التي تُهيئها للتمزق وتختثر الدم [40]. ونمطياً، تتكون هذه اللويحات من قلب دهني كبير، مغطى بغطاء ليفي رقيق، تأوي عدداً قليلاً نسبياً من خلايا عضلية ملساء، وعدد كبير من الخلايا البلعمية الكبيرة المنشطة، ونشوء أوعية دموية جديدة بغزارة (الشكل رقم ٩,٢) [40]. إن القلب (اللب) الدهني الكبير معروف لزعة استقرار الآفات بتوجيه الشد أو الإجهاد الميكانيكي إلى مناطق الكتف الهشة للتجمع [42]. وهتك القلب الدهني حتى خلال تمزق موضعي صغير، يمكن أن يحدث بدء سلسلة التخرت بعامل النسيج [43]. كما يُضعف نقص الخلايا العضلية الملساء الغطاء الليفي أيضاً [44]؛ مما يُسهّل تمزق التجمع.



الشكل رقم (١، ٩). تطور آفات تصبب الشرايين في خطوات منفصلة؛ مما يؤدي إلى تكوين مجموعة واسعة من أنواع الآفات في مريض واحد. ورغم أن كل هذه الأنواع من الآفات، قد تؤدي إلى الجلطات الدموية thromboembolism، فقط الآفات الأكثر تقدماً، تنتج تضيقها تجويفها. ومن اليسار إلى اليمين: (أ) آفة معرضة للتمزق بقلب دهني كبير، وغطاء ليفي رقيق مخترق بخلايا بالعمية كبيرة. (ب) آفة معرضة بخرقة أو جلاطة انسداد ثانوي ومنظمة ميكراً. (ج) آفة معرضة للتآكل (الدهم) بصفوفة من البروتوجليسان proteoglycan، في آفة غنية بالخلايا العصبية المسماة. (د) ترسب متآكل بخرقة انسداد ثانوي. (هـ) نرف ثانوي داخل آفة تضيقية مزمنة بتكلس شديد، وتخثر قديم، وتجويف لا مركزي. (و) العقد المتكلسة المنتشرة في التجويف الوعائي. (ز) آفة تضيقية مزمنة بتكلس شديد، وتخثر قديم، وتجويف لا مركزي. (أعيد طبعها بإذن من المرجح [40]).



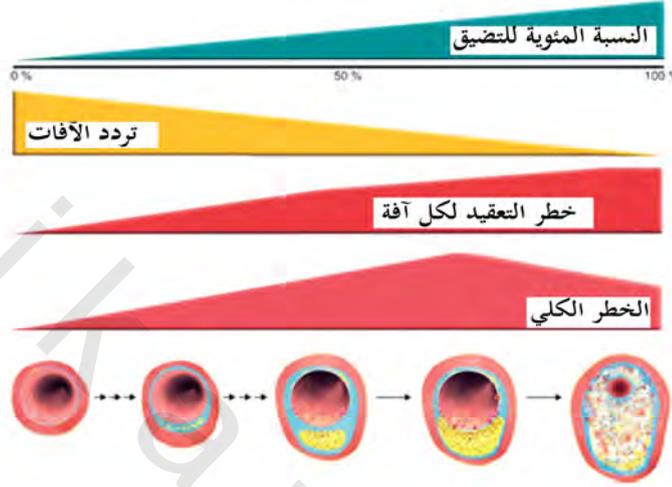
الشكل رقم (٩،٢). النوع الأكثر شيوعاً من آفة ضعيفة لاتضيقة. إن الغطاء الليفي الرقيق، وتسرب الخلايا البلعمية الكبيرة الشامل، ونضوب الخلايا العضلية الملساء، والقلب الدهني الكبير؛ تسهم جميعها في ميول (نزعة) الآفة للتمزق. (أعيد طبعها بإذن من المرجع [40]).

إن تجمع الخلايا البلعمية الكبيرة، بالإضافة إلى الخلايا الالتهابية، يفرز عادةً مستويات مرتفعة من إنزيمات تحلل البروتينات الفلزية MMP، تستطيع أن تهدم القبة (الغطاء) الليفية، ويحتمل هتك القلب الدهني المتخثر [45, 46]. ويمكن أن يؤدي رفع تنظيم نشوء الأوعية الدموية إلى تآكل المصفوفة الخلوية الخارجية، واستبدالها بطبقات وعائية جديدة هشة فيزيائياً، وإضعاف الغطاء الليفي، وتعزيز تمزق التجمع [47-49]. ويتم تحقيق تشخيص وتوصيف معظم لويحات تصلب الشرايين في الممارسات السريرية الحالية، عن طريق قسطرة catheterization الأشعة السينية الانتشارية. والآفات عالية التضيقية (عالية التضيق) stenotic- نموذجياً بتضيق يصل إلى ٥٠٪ أو أكثر من القطر التجويفي- هي المحددة للتدخل العلاجي الفوري، بينما تعد الآفات الأقل

تضييقية عموماً ضئيلة سريريا. ومن المفارقات أن هذه اللويحات غالباً ما تكون آفات بحد ذاتها عرضة للتمزق؛ مما يؤدي إلى النوبات القلبية والسكتة الدماغية [50, 51]. ويستخدم أيضاً التصوير النووي، أو التصوير بالموجات فوق الصوتية المستخدم لاختبارات الإجهاد على نطاق واسع؛ لكشف انسدادات الأوعية الدموية محددة التدفق، أثناء مدى من التحديات الأيضية. وبطريقة مشابهة لتصوير الأوعية بالأشعة السينية الانتشارية، على أية حال، فهذه التقنيات غير حساسة للويحات ذات درجة التضييق المنخفضة، والتي تكون عرضة للتمزق. ولأن تمزيق لويحات تصلب الشرايين، غالباً ما تظهر في الشرايين بدرجات تضييق متواضعة (٤٠-٦٠٪) فقط، فإنها تبقى بعيدة المنال تشخيصياً بتقنيات التصوير السريري الروتينية. وإذا تم تمييز الانسداد، وتحديد موضعه، ستكون هناك فرصة سانحة تمتد من أيام إلى شهور للتدخل، و/ أو لتثبيت اللويحات طبيياً، قبل أن يترتب على ذلك حدوث أخطار سريرية أكثر جدية [41]. وتدور الصعوبة الرئيسة حول الحقيقة بأن تصلب الشرايين، ينتج العديد من اللويحات في كافة أنحاء الجهاز الوعائي، وليس من الممكن عملياً معالجة كل آفة على حدة. فقد يتمزق جزء صغير فقط من كل الآفات التضييقية > ٥٠٪؛ مما يؤدي إلى الأحداث السريرية (الشكل رقم ٩.٣) [40]. وتوجد فرصة جديدة ومهمة لتحديد أي من الآفات تكون عرضة للتمزيق، وتطبيق المعالجة العلاجية على المناطق المرضية فقط، التي تشكل خطراً فورياً.

ويجري حالياً تنفيذ تقنيات التصوير الجزيئي مع أهداف كل من الوقاية الأولية والثانوية لتصلب الشرايين. وتركز الوقاية الأولية على تحديد المرضى في المراحل المبكرة من تطور تصلب الشرايين؛ مما يؤدي إلى تطبيق أسلوب حياة خاص، و/ أو علاج دوائي؛ لمنع تطور تجمع إضافي، وربما حتى انحسار هام للويحات غير المستقرة أو الضعيفة الموجودة. وتهدف الوقاية الثانوية إلى اكتشاف اللويحات التي تكون عرضة

لتهديد التمزق (أيام وأسابيع)، والجلطات الدموية في المرضى بمرض تصلب الشرايين المتقدم؛ مما يسمح بالتدخل الشديد المركز فقط على المناطق المرضية الأكثر خطورة.



الشكل رقم (٩,٣). العلاقة بين تردد الآفات، ودرجة التضييق، وخطر التعقيد لكل آفة كدالة في تقدم الآفة. على الرغم من أن متوسط الخطر المطلق للآفات التضيقية جداً، قد يكون أعلى من متوسط الخطر المطلق للآفات التضيقية المعتدلة، فأقل ما يقال: إن هناك آفات بتضييق معتدل أكثر من الآفات بتضييق شديد. (أعيد طبعها بإذن من المرجع [40]).

٩,٣ التصوير الخلوي والجزيئي

Cellular and Molecular Imaging

لتحقيق تصوير جزيئي و خلوي فعال بالرنين النووي المغناطيسي، ينبغي تصميم عوامل تباين مستهدفة، لتحقيق دورة عمر النصف طويلة والحساسية، وربط انتقائي للحاتمة ذات الاهتمام، وتحسين بارز لنسبة الضوضاء إلى التباين، وسمية مقبولة، وسهولة الاستخدام السريري، وإمكانية تطبيقها بأنظمة التصوير القياسية المتوافرة تجارياً.

كما توضح الاكتشافات في علم الأحياء الجزيئية علامات جزيئية وخلوية لمجموعة واسعة من الأمراض. وقد تعمل هذه المؤشرات أو العلامات كأهداف لعوامل التباين؛ لتوفير تصوير نوعي وحساس للمظاهر الباثولوجية (المرضية) المبكرة. وهناك مجموعة لأنواع مختلفة من الليجاندات، يمكن أن تستخدم للاستهداف، بما في ذلك الأجسام المضادة، والبيبتيدات، والسكريات المتعددة، والأبتامرات aptamers، إلخ. وتستخدم المجالات الناشئة للتصوير الخلوي والجزيئي تقنيات النانو؛ لتطوير عوامل تباين مستهدفة للكشف غير المنتشر عن المؤشرات الجزيئية للمرض. وخلافاً لعوامل حشد الدم (تجمع الدم) blood pool، تُنتج عوامل التباين المستهدفة إشارة مُعززة من الأنسجة المرضية (الباثولوجية)، وما عدا ذلك سيكون من الصعب تمييزها عن الأنسجة الطبيعية المحيطة. ولقد تم تطوير تقنيات التصوير الخلوية والجزيئية لمعظم طرائق التصوير السريري، بما في ذلك التصوير النووي، والتصوير بالموجات فوق الصوتية، والتصوير بالرنين المغناطيسي، والتصوير الشعاعي الطبقي المحسوب، والتصوير البصري. وعلى أية حال، قد يتمتع التصوير بالرنين المغناطيسي بعدة مزايا عن الطرائق الأخرى، مثل الوضوح العالي، والتباين التشريحي العالي، ونسبة الإشارة إلى الضوضاء العالية، وتوافر سريري واسع الانتشار، وعدم وجود إشعاع متأين.

لا تعتمد تقنيات التصوير هذه على تباين النسيج الأصلي، أو دقة الوضوح المرتبطة بنمطية التصوير في الأساس. وبدلاً من ذلك، فإنها تُحسن (الإظهار) للمناطق الصغيرة جداً من المرض، باستهداف مباشر للعمليات الخلوية أو الجزيئية المسؤولة عن التحويل الباثولوجي (المرضي) للأنسجة. وعلاوة على ذلك، فباستهداف العمليات الجزيئية الأساسية، تستطيع تقنيات التصوير هذه توفير معلومات فريدة؛ لتوصيف الحالة الأيضية المعقدة للمرض. ويمكن أن تقدم هذه المعلومات نظرة حاسمة للجوانب

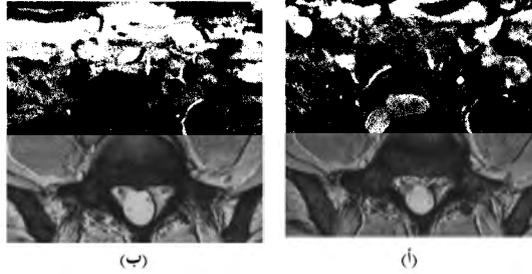
العلاجية المختلفة، بما في ذلك تقييم الخيارات العلاجية المحتملة، والتنبؤ، والمراقبة للاستجابة العلاجية.

يعتمد تباين الصورة في التصوير بالرنين المغناطيسي غالباً على خواص استرخاء الأنسجة [53]. وهناك ثلاثة أزمنة استرخاء أساسية: استرخاء طولي (T_1)، واسترخاء مستعرض ذاتي (T_2)، واسترخاء مستعرض ظاهري (T_2^*)، كل بمعدل استرخاء مرتبط: $1/T_1$ ، $1/T_2$ ، و $1/T_2^*$ [54, 55]. ويتم تصميم عوامل تباين التصوير بالرنين المغناطيسي، لتقصير أزمنة الاسترخاء في الأنسجة ذات الاهتمام، وبناء عليه تزداد معدلات الاسترخاء [56]. يصف زمن الاسترخاء الطولي (T_1) نمو إشارة التصوير بالرنين المغناطيسي خلال تتابع النبض، وهكذا يسمح تقصير زمن الاسترخاء الطولي (T_1) باسترداد الإشارة بسرعة أكبر؛ ولذلك صُمِّمت عوامل تباين للتأثير على نزعة (T_1)؛ لتوفير إشارة تصوير بالرنين المغناطيسي متزايدة. ومن ناحية أخرى، فكل من زمني الاسترخاء (T_2) و (T_2^*)، يصفان اضمحلال (تداعي) إشارة التصوير بالرنين المغناطيسي. وتقصير أزمنة الاسترخاء هذه، تقلل إشارة التصوير بالرنين المغناطيسي. ونموذجياً، تعمل عوامل التباين على زيادة معدل الاسترخاء في نمط خطي؛ ولذلك يُعطي رسم العلاقة $1/T_1$ مقابل تركيز عامل التباين خطاً مستقيماً. ويتطابق ميل هذا الخط مع استرخائية عامل التباين، ويعطى بالوحدات ث^{-1} ملي مول $^{-1}$. إن الاسترخائية تكون مقياساً لفاعلية عامل التباين. وبالتالي فإن المركب ذا الاسترخائية الأعلى، يمكن أن يوفر تبايناً أعلى في تركيز معين، أو تبايناً مماثلاً في تركيز أقل. وعادةً تُقاس الاسترخائية نسبةً إلى تركيز أيون بارامغناطيسي، أو فائق البارامغناطيسية، مثل الجادولينيوم أو الحديد. ولتطبيقات التصوير الجزيئي والخلوي. على أية حال، فالاسترخائية لكل جسيم نانوي، بمعنى: الاسترخائية الجزيئية أو الجسيمية، هي أكثر فائدة لمقارنة تأثير عامل التباين لكل موقع ترابط.

٩,٤ التصوير الخلوي بأكاسيد الحديد

Cellular Imaging with Iron Oxides

إن جسيمات أكسيد الحديد النانوية فائق البارامغناطيسية فائق الصغر (USPIO) *Ultrasmall superparamagnetic iron oxide*، تعد عوامل تباين فعالة للتصوير بالرنين المغناطيسي. ويُحدث الحديد تشويشات موضعية قوية في المجال المغناطيسي لمساحات التصوير بالرنين المغناطيسي؛ مما يؤدي إلى زيادة زمن الاسترخاء المستعرض الظاهري (T_2^*). وهذه الزيادة في زمن الاسترخاء، تسبب انخفاضاً في كثافة الصورة في المناطق التي يتراكم فيها أكسيد الحديد، ويُطلق عليها "صانعات الحساسية أو القابلية الحساسية" "susceptibility artifacts". ونتيجة للتغيير الهائل في إشارة التصوير بالرنين المغناطيسي المستحث بجسيمات فائقة البارامغناطيسية، فقد تم تطويرها بالنسبة لمجموعة واسعة من تطبيقات عامل التباين، تشمل تصوير الأوعية الدموية، والأمعاء، والكبد، والطحال، والخلايا اللمفاوية، ونخاع العظام والأورام، والعلاج بالخلايا الجذعية [57-59]. وبشكل خاص، تمتلك الجسيمات - بقطر يتراوح من ١٥ إلى ٢٥ نانومتر - عمر نصف دوران طويل جداً، ويتم تناولها بشكل تفضيلي من قبل الخلايا البلعمية الكبيرة في الجسم، حينما تكون مغطاة بالدكستران. ولقد سمحت هذه الخواص باستخدام جسيمات أكسيد الحديد النانوية فائقة البارامغناطيسية، فائقة الصغر USPIO، المغلفة بالدكستران؛ في التصوير المستهدف السلبي للعمليات الالتهابية المرضية، مثل لويحات تصلب الشرايين غير المستقرة، عن طريق التصوير بالرنين المغناطيسي (الشكل رقم ٩,٤) [60]. لقد أظهرت الخلايا البلعمية الكبيرة المرقومة بأكسيد الحديد فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر USPIO تراكماً تفضيلاً للويحات غير المستقرة والممزقة (٧٥٪ امتصاصاً عملياً)، ولكن ليس في الآفات المستقرة (٧٪ فقط، تظهر امتصاص أكسيد الحديد فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر USPIO) [61].



الشكل رقم (٤، ٩). صورة للتصوير بالرنين المغناطيسي، بانحدار صدى محوري ثنائي الأبعاد في مستوى الشرايين الحرقفية العامة. (أ) قبل (ب) بعد ٢٤ ساعة من إدارة أو تعاطي أكسيد الحديد فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر USPIO. توضح صورة التباين المسبق بؤراً صغيرة من كثافة إشارة منخفضة داخل جدار الشريان الحرقفي العام الأيسر، ربما تمثل التكلس (السهم، أ). على صورة التباين البعدي، يرى فقدان إشارة واضح لكامل المقطع العرضي للشريان (السهم، ب). ولا يعرض الشريان الحرقفي الأيمن جودة صورة مقبولة؛ لأنها تؤخذ من خلال مسار منحرف خلال مستوى الصورة (رأس السهم، ب). (أعيد طبعها بإذن من المرجع [60]).

يجب تحسين عدة سمات لجسيمات أكسيد الحديد النانوي، فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر USPIO؛ للحصول على رؤية ناجحة للويحات تصلب الشرايين، عن طريق التصوير بالرنين المغناطيسي. ويجب أن تتقيد صياغة أكسيد الحديد، فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر USPIO بمتطلبات فيزيائية وكيميائية معينة. على سبيل المثال، فالجسيمات التي تفتقر لغطاء الدكستران، لا تُبتلع بفعالية من قبل الخلايا الالتهابية inflammatory cells. كذلك فالجسيمات بقطر مماثل للبروتين الدهني منخفض الكثافة (LDL)، في مدى ١٥-٢٥ نانومتر، وذات عمر نصف دوران في نطاق الساعات، توفر الزمن الكافي للتراكم الخلوي، والتوصيل الفعال إلى لويحات تصلب الشرايين [62]. وبالإضافة إلى ذلك، فللجرعة من أكسيد الحديد فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر (USPIOs) تأثير مثير على التباين بالتصوير بالرنين

المغناطيسي، كما أن زيادة الجرعة بعامل أربع مرات، ينتج عنها فقدان في الإشارة في الشرائح عشر مرات أكثر [62].

إن بروتوكولات التصوير تعتبر ذات أهمية حاسمة أيضاً؛ لكشف أكسيد الحديد فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر USPIO عن طريق التصوير بالرنين المغناطيسي، كما أن صناعات الحساسة الناشئة عن تراكم أكسيد الحديد فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر USPIOs، هي الأكثر حساسية للتصوير بتتابع تصوير موزون ب T_2^* . إن تتابع تصوير كثافات بروتونية موزون ب T_1 ، يكون أقل حساسية من صناعات الحساسة المستحثة بامتصاص أكسيد الحديد فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر USPIO في الأنسجة [61]. وعادة ما يستخدم التتابع الموزون ب T_2^* ، تقنيات المنحدر الصدى بأزمة صدى طويلة، كما أن زمن الصدى الطويل، يُظهر فقداناً للإشارة؛ بسبب وجود أكسيد الحديد فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر USPIOs، ولكن هذا التتابع يميل أيضاً نحو المعاناة من انخفاض نسبة الإشارة إلى الضوضاء. وفي كثير من الأحيان، تُستخدم الملفات عالية التخصصية، مثل ملفات مصفوفة متوافقة الطور، أو ملفات تطبيق سطحية نوعية، من أجل تكبير نسبة الإشارة المتوفرة إلى الضوضاء [60, 61].

عادة ما تكون الأوعية الدموية محاطة بنسيج دهني، قد يتداخل مع تصوير التراكيب داخل الجدار الشرياني. وتظهر الدهون كإشارة لامعة في التصوير بالرنين المغناطيسي، والتي غالباً ما تُظهر صانع فقد تسجيل مكاني spatial misregistration artifact، نسبة إلى الأنسجة الأخرى في الجسم، ويسمى صانع "الإزاحة الكيميائية". وهذا الصانع في كثير من الأحيان، يمكن أن يتداخل مع الإشارات من جدار الوعاء الدموي، ويطمس لويحات (ترسبات) تصلب الشرايين قيد الفحص. ولتجنب هذه المشكلة، يستعمل تصوير متتابع، يستخدم تقنيات كبح

الدهون، أو إثارة انتقائية لتصوير امتصاص أكسيد الحديد فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر USPIO [60-62]. وبهذا التابع تظهر الدهون مظلمة؛ لأن إشارتها إما أن تكون مكبوحة أو غير مثارة. وبطريقة مماثلة يُستخدم التابع لتصوير الدم الساطع - مثل التابع اللقطة منخفضة الزاوية السريع، ثنائي الأبعاد (FLASH) - في أغلب الأحيان للكشف عن أكسيد الحديد فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر USPIOs [60, 61]. وتسمح إشارة الدم الساطع بتحديد أكثر وضوحاً للتجويف الوعائي، وفراغات الإشارة في جدار الشريان الناجمة عن امتصاص أكسيد الحديد فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر USPIOs، وحينئذ يكون من السهل جداً تمييزها.

بالإضافة إلى بروتوكول التصوير نفسه، فإن اختيار وقت التصوير بعد حقن أكسيد الحديد فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر USPIOs، يعد أمراً بالغ الأهمية. إن عمر نصف الدوران الطويل لأكسيد الحديد فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر USPIOs، المغلف بالدكستران ضروري لتحقيق تحميل كافٍ في الخلايا الالتهابية، ولكن يمكنها أن تتداخل مع الصور عالية الجودة المكتسبة. وحتى بعد مرور ٢٤ ساعة تقريباً من تعاطي أكسيد الحديد فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر USPIO، يكون تركيز الدم مرتفعاً بما فيه الكفاية؛ لخلق صناعات الصورة [61, 62]، التي تستطيع حجب رؤية الجدار الوعائي. ومن جهة أخرى، قد يؤدي التأخير الطويل جداً (~ ٧٢ ساعة)، بعد حقن أكسيد الحديد فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر USPIO إلى صناعات حساسية غير قابلة للكشف [61].

٩,٥ التصوير الجزيئي بجسيمات بارامغناطيسية نانوية

Molecular Imaging with Paramagnetic Nanoparticles

كأسلوب بديل، اقترحنا وقيماً ليجاند مستهدفاً، ودهوناً مغلفة، ومستحلب جسيم البيرفلوروكربون النانوي اللاغازي لتطبيقات التصوير الجزيئي (الشكل رقم

(٩,٥) [12, 15, 26, 28]. ويمكن صياغة الجسيمات النانوية لحمل أيونات الجادولينيوم البارامغناطيسية، وتوجيهها إلى عدد من الحواتم الكيميائية الحيوية المهمة، مثل الفيبرين fibrin، عامل النسيج، و $\alpha_v\beta_3$ -إنتجرين $\alpha_v\beta_3$ -integrin. إن ترسب الفيبرين، يعد أحد الإشارات الأولية لتمزق اللويحات؛ مما يتيح كشف الآفة "المسببة للمرض"، قبل أن يتشكّل تضيق وعائي عالي الدرجة [63]. وعامل النسيج هو عامل تخرّ آخر، يظهر على سطح الخلايا العضلية الملساء الوعائية، والتي تسهم في عودة التضيق بعد إجراء جراحة الأوعية الدموية، أو بعد وضع الدعامات [64].



بما في ذلك الأجسام المضادة، الببتيدات، المحاكيات، أو الأبتامرات

الشكل رقم (٩,٥). مثال للتصوير الجزيئي المعمم لجسيمات بارامغناطيسية نانوية مستهدفة لليجاندا.

بينما يمكن استعمال الفيبرين وعامل النسيج لتحديد أمراض الأوعية القلبية غير المستقرة، فإن $\alpha_v\beta_3$ -إنتجرين يعد مؤشرا عاما لتصلب الأوعية الدموية، ويؤدي دوراً مهماً في تشكيلة واسعة من الحالات المرضية [65]. و $\alpha_v\beta_3$ -إنتجرين عبارة عن جزيء التصاق ثنائي الوحدة غير متجانس مميز جيداً، والذي يظهر على نحو واسع بالخلايا البطانية، الخلايا الوحيدة (الوحدات)، والخلايا الليفية، والخلايا العضلية

الوعائية الملساء. وبشكل خاص، يؤدي $\alpha_v\beta_3$ -الإنترجرين دوراً مهماً في هجرة الخلية العضلية الملساء والالتصاق الخلوي [66, 67]، وكلاهما مطلوب لنشوء الأوعية الدموية الجديدة. ويظهر $\alpha_v\beta_3$ -الإنترجرين على السطح التجويفي للخلايا البطانية المنشطة، ولكن ليس على الخلايا الحامدة البالغة [68]. ولقد أثبتنا فائدة الجسيمات النانوية مستهدفة الـ $\alpha_v\beta_3$ -الإنترجرين؛ لكشف وتوصيف نشوء الأوعية الدموية المرتبط بتعبير عامل النمو [69]، ونمو الورم [70]، وتصلب الشرايين [33].

يؤدي نشوء الأوعية الدموية دوراً حساساً في نمو اللويحات وتمزقها [71]. وتستلم الشرايين الطبيعية كبيرة العيار (القطر) في البشر الأوكسجين والمواد المغذية من الدم، الذي يتسلمه من أوعية العروق البرانية، وليس بالضرورة من التجويف الوعائي نفسه. وتقوم أوعية العروق العادية بحمل الدم في الاتجاه نفسه، مثل التدفق الشرياني، وتمتد فروع عمودية حول جدار الوعاء الدموي؛ لتزويد الأنسجة العميقة. وفي مناطق آفات تصلب الشرايين، تتكاثر الأوعية الوعائية من أوعية العروق؛ لتلبية المطالب الأيضية المرتفعة لنمو اللويحة [72]. ويشجع تصلب الشرايين كلا من الالتهاب، ونشوء الأوعية الدموية في الجدار الشرياني، وربما عن طريق نوع من التغذية المرتدة الإيجابية للنظام. وتحفز الخلايا الالتهابية داخل الآفة نشوء الأوعية الدموية، من خلال الإشارات الجزيئية الموضعية، والتي بدورها تعزز نمواً وعائياً جديداً، وتهيئ بذلك طريقاً لمزيد من الخلايا الالتهابية لدخول اللويحات. وتنتج هذه العملية ارتباطاً قوياً بين مدى نشوء أوعية اللويحات، والتراكم الموضعي من الخلايا الالتهابية [73].

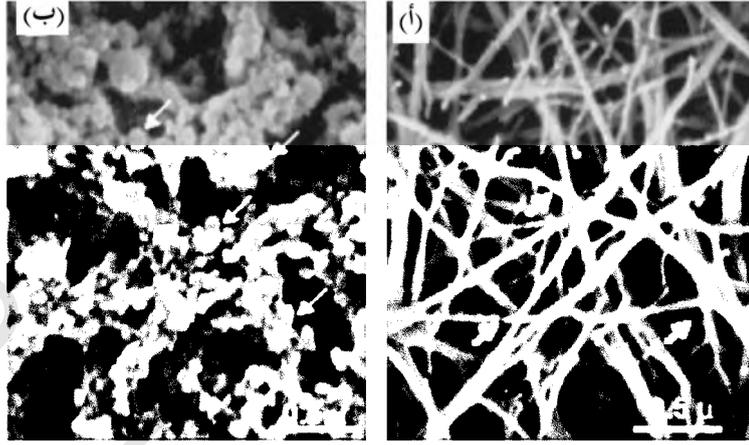
٩,٥,١ تحقيق الأمثلة لكيمياء الصياغة

Optimization of Formulation Chemistry

إن التطوير الناجح لعامل تباين الجسيم النانوي المستهدف، يتطلب تحقيق الأمثلة لإجراءات صياغة عديدة، بما في ذلك العدد والتركييب الكيميائي لمخليات

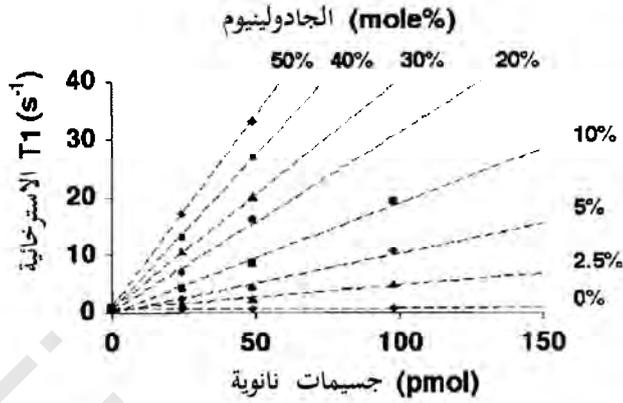
بارامغناطيسية، وليجانادات الاستهداف. وحتى عملية اختيار الهدف، يجب أن تكون مثلى، كما يجب أن يظهر جزيء الهدف بتراكيز مرتفعة نسبياً في النسيج المريض، وعند مستويات منخفضة جداً في النسيج الطبيعي. كذلك يجب أن يكون تركيب عامل التباين قادراً على الوصول إلى الهدف بسهولة. وعلى سبيل المثال، تستطيع جسيمات نانوية بقطر ٢٠٠ نانومتر مواجهة المستقبلات وربطها على الجانب التجويفي للخلية البطانية، ولكن ربما لا يكون بشكل مباشر لأجزاء الحمض النووي DNA داخل نواة الخلية العصبية. كما ينبغي أن يمتلك ليجاند الهدف ألفة عالية للهدف المهم، وتربطاً أدنى ما يمكن للمستقبلات المماثلة، التي قد تظهر على الأنسجة الطبيعية. وبالإضافة إلى ذلك، فيجب أن يحتفظ الليجاند بالاستقرار والفعالية خلال كافة مراحل عملية صياغة الجسيمات النانوية. وعلى سبيل المثال، قد تتغير طبيعة الأجسام المضادة أو أجزاءها، وتفقد قدراتها على الاستهداف خلال خطوات معالجة كيميائية شديدة، كعملية تعقيم منتج الجسيمات النانوية النهائي. وقد تكون ليجانادات الاستهداف الأخرى، مثل الكربوهيدرات، والأبتامرات، أو محاكيات الببتيد peptidomimetics، أقل حساسية لإجراءات الصياغة هذه، وتحتفظ بنشاطها الحيوي.

لقد كان التصوير الجزيئي باستخدام جسيمات البيرفلوروكربون النانوية السائلة متبعاً أصلاً لاستهداف ترسبات الفيبرين على لويحات تصلب الشرايين الممزقة [12, 25-28]. وبدمج جسم مضاد لمضاد الفيبرين داخل الجسيمات، يمكن أن توجه انتقائياً طبقة كثيفة من الجسيمات النانوية إلى سطح جلطة الفيبرين (الشكل رقم ٩،٦) [25]. ويوفر هذا النموذج منصة قوية لاستكشاف الآثار المترتبة على التغييرات في كيمياء صياغة الجسيمات النانوية.



الشكل رقم (٦، ٩). صورة المجهر الإلكتروني الماسح بقوة تكبير (30000x) (أ) لجلطة فيبرين تحت السيطرة. (ب) وجسيمات نانوية بارامغناطيسية مستهدفة الفيبرين، مرتبطة بسطح الجلطة. (ب) تشير الأسهم إلى (أ) ليفية الفيبرين. (ب) حاتمات فيبرين مرتبطة بجسيم نانوي نوعي الفيبرين، (أعيد طبعها بإذن من المرجع [25]).

على عكس عوامل أكسيد الحديد فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر USPIO، التي نُوقشت سابقاً، فإن خواص تحسين الصورة من عوامل تباين بارامغناطيسية متوفرة تجارياً، تكون صغيرة جداً لإظهار التراكيز الخفيفة جداً، من بيكومول إلى نانومول، من الحواتم ذات الصلة بالتصوير الجزيئي. ودمج أعداد كبيرة من المعقدات البارامغناطيسية (< 50000) في كل جسيم، فإنه يتعاضم بشكل مثير جداً تحسين الإشارة المحتمل لكل موقع ترابط، بعامل تكبير < 10⁷. وينشأ التأثير البارامغناطيسي المتزايد عن آليتين: تزايد الاسترخائية لكل جسيم خطأً بالنسبة إلى عدد معقدات الجادولينيوم، وتزايد الاسترخائية من كل معقد جادولينيوم؛ بسبب التقلب الأبطأ للجزيء، عندما يكون مرتبطاً بجسيم أكبر بكثير. وبدراسة تخفيف الجسيمات النانوية في الماء، لاحظنا استرخائية T₁ مع زيادة حمولات الجادولينيوم (الشكل رقم 9.7) [25].

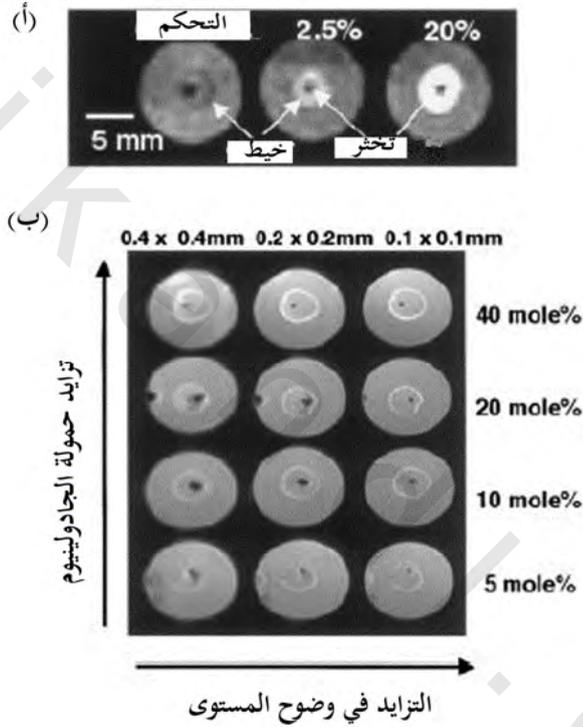


الشكل رقم (٩,٧). معدلات الاسترخاء T_1 كدالة في عدد الجسيمات النانوية، معبر عنها بوحدة بيكومول لمدى صياغات، يتراوح من صفر إلى ٥٠% مول Gd-DTPA-BOA في الطبقة الدهنية الأحادية الخارجية ٢%. (أعيد طبعها بإذن من المرجع [25]).

ولقد تحققنا أيضاً من أن زيادة الاسترخائية المشاهدة في المحلول، تقابل زيادة كثافة الإشارة على الصور الموزونة بـ T_1 من الجسيمات المرتبطة بجلطات الفيبرين (الشكل رقم ٩,٨) [25]. وهكذا يمكن تقييم التحسينات في كيمياء الصياغة في مشابهاً بسيطة من تخفيفات الجسيم النانوي، والتحقق منها في نماذج الأنظمة الفسيولوجية.

كما قدّم نموذج تجلط الفيبرين وسيلة لتقييم التأثير البارامغناطيسي لتراكيب مخليبات الجادولينيوم المختلفة [27]. وتم قياس استرخائية T_1 (r_1) الجسيمات النانوية المصاغة بجادولينيوم - ثنائي أوليات حمض خماسي الخل - ثلاثي الأمين - ثنائي اثيلين ، gadolinium diethylene-triamine-pentaacetic acid bis-oleate (Gd-DTPA-BOA) [74] ، أو جادولينيوم - فوسفاتيل إيثانول أمين - حمض خماسي الخل - ثلاثي الأمين - ثنائي إيثيلين gadolinium diethylene-triamine-pentaacetic acid- (Gd-DTPA-PE) [75] phosphatidylethanolamine في قوى مجال مغناطيسي مختارة: ٠,٤٧، تسلا، ١,٥

تسلا، ٤,٧ تسلا. وكانت قيمة r_1 لصياغة Gd-DTPA-PE في كل قوى المجال المغناطيسي تقريباً أكبر بمرتين من r_1 للعامل Gd-DTPA-BOA [27]؛ مما يدل على أن التعديلات الصغيرة على الشكل الجزيئي لمخليات بارامغناطيسية، يمكن أن تحسن كثيراً الخواص الاسترخائية الأساسية.

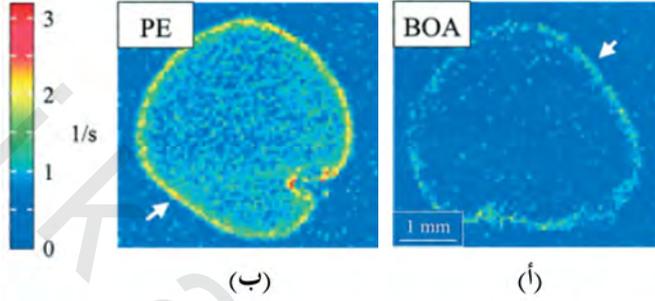


الشكل رقم (٩,٨). (أ) تصوير بالرنين المغناطيسي مخفض الوضوح لجلطات فيبرين مستهدفة بوجود جسيمات نانوية متجانسة، وتحسين موزون- T_1 ، يتحسن بزيادة مستوى الجادولينيوم (٥، ٢,٥، ٢ و ٥٢ مول). (ب) مسح عالي الوضوح لجلطة فيبرين، يكشف عن طبقة رقيقة من جسيمات نانوية على طول السطح. وتزداد إشارة القمة بزيادة تركيز الجادولينيوم (٥، ١٠، ٢٠، ٤٠ و ٥٤ مول)، وتخفيض حجم فوكسل (٤، ٢، ٠، ١ و ٠,١ ملم). (أعيد طبعها بإذن من المرجع [25]).

لقد أوضحت قياسات الاسترخائية متغيرة درجة الحرارة، أن قيمة r_1 لمستحلب الـ Gd-DTPA-BOA، كانت مستقلة بشكل كبير عن درجة الحرارة [27]. وفي المقابل زادت قيمة r_1 في درجات الحرارة العالية بالنسبة لمستحلب الـ Gd-DTPA-PE. وتشير هذه البيانات المعتمدة على درجة الحرارة إلى أن معدل تبادل الماء مع الأيون المغناطيسي، يكون أعلى في محليبات الـ Gd-DTPA-PE من الـ Gd-DTPA-BOA. وفي درجة الحرارة العالية، تزداد قيمة r_1 لجسيمات الـ Gd-DTPA-PE النانوية؛ نتيجة لسرعة تبادل الماء، وزيادة النشاط الحركي. وعلى أية حال، فقد تواجه جسيمات الـ Gd-DTPA-BOA النانوية، وصول ماء مقيد جيداً، وعدم الاستفادة من النشاط الحركي المتزايد للماء في درجة حرارة الأعلى. وقد نتج تبادل الماء المتزايد هذا من المواضيع المرتفعة للمخليبي، نسبة إلى مستوى مجموعة الفوسفات الرئيسة لجسيمات الـ Gd-DTPA-PE النانوية [75]، والتي ساهمت على الأرجح في الزيادة الملحوظة لاسترخائية الجسيمات النانوية الـ Gd-DTPA-PE.

يجب أن تؤكد التحسينات في صياغة عامل التباين، مثل زيادة معدل الاسترخاء، بالجسيمات النانوية المرتبطة بهدف فسيولوجي. وبالإضافة لتقييم تأثيرات البارامغناطيسية للجسيمات النانوية المرتبطة، فإن هذه التجارب ضرورية؛ لتحديد ما إذا كانت التغييرات في كيمياء محليبي الجادولينيوم، تؤثر على قدرة الاستهداف النهائية للصياغة أم لا. وتم تجميع استرخاء T_1 لخلائط (R₁) لجلطات الفيبرين المعالجة بالجسيمات النانوية، إما من الـ Gd-DTPA-BOA أو الـ Gd-DTPA-PE عند ١,٥ تسلا (الشكل رقم ٩,٩) [27]. وتوضح هذه الخرائط الملونة قيماً أعلى لـ R₁ على سطح جلطة الـ Gd-DTPA-PE، وتعرض تأثيراً بارامغناطيسياً متزايداً بصياغة الجسيمات النانوية هذه، حتى عندما ترتبط بألياف الفيبرين. وبالمقارنة مع المناطق الداخلية للجلطة، تشهد الطبقة السطحية من جسيمات الـ Gd-DTPA-PE النانوية زيادة قيمة R₁ على هامش الجلطة

بنسبة ٧٢٪ ، مقارنة إلى ٤٨٪ زيادة فقط مع عامل Gd-DTPA-BOA. ووجد أن كثافة الجسيمات النانوية لكل من Gd-DTPA-BOA و Gd-DTPA-PE على سطح الجلطة كانت متطابقة [27] ؛ مما يدل على أن تغيير متخالل البارامغناطيسية إلى Gd-DTPA-PE ، لم يؤثر سلباً على ترابط عامل التباين.



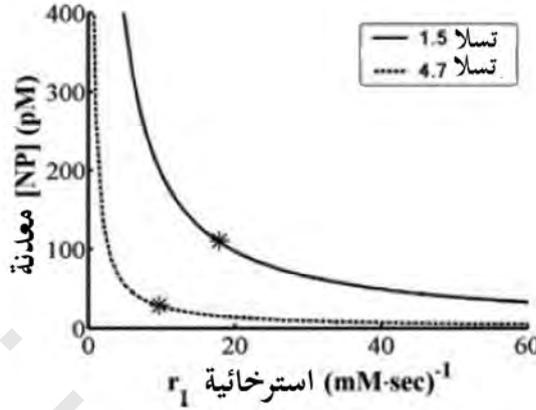
الشكل رقم (٩،٩). خرائط استرخاء T_1 مكتسبة عند ١،٥ تسلا لجلطات بلازما بشرية مستهدفة بجسيمات نانوية (أ) Gd-DTPA-BOA أو (ب) Gd-DTPA-PE. الجسيمات النانوية من Gd-DTPA-PE تحت R_1 أعلى بكثير على السطح الجلطة (الأسهم البيضاء)، مقارنة بجسيمات الـ Gd-DTPA-BOA النانوية. (أعيد طبعها بإذن من المرجع [27]).

وإذا كنا برهنا على أن الاسترخائية المتزايدة، تزيد من تصور (رؤية) الحواتم المستهدفة، فإن هذه التقنيات يمكنها فقط أن تُحسّن التصوير الجزيئي لمدى محدود. وباستخدام برامج نمذجة إشارة التصوير بالرنين المغناطيسي، نستطيع أن نقيّم نظرياً تشكيلة كبيرة من استرخائيات عامل التباين في قوى المجال المغناطيسي المختلفة (الشكل رقم ٩،١٠) [76]. وتزداد نسبة الإشارة إلى الضوضاء في المجالات المغناطيسية الأعلى ؛ مما يؤدي إلى زيادة التباين بالنسبة إلى الضوضاء، وتقليل حد الكشف لترابط عامل التباين. ولذلك نتوقع أن تطبيق قوى المجال السريري الأعلى - على سبيل المثال ٣ تسلا- سيُحسّن بشكل كبير أداء عوامل التصوير الجزيئي الحالية، ويساعد في دفع هذه

التقنيات نحو الممارسة السريرية. وعلى أية حال، فزيادة استرخائية البارامغناطيسية لعامل التصوير الجزيئي، لن تُحسّن حد الكشف الأدنى في شكل خطي، ولكن تتناقص النتائج بالأحرى في قيم الاسترخائية العالية، كما هو موضح من قبلنا [76] ومن آخرين [77]. ولذلك سوف تقدم الجهود الرامية إلى تحسين أداء عوامل التباين في التصوير الجزيئي من خلال زيادة الاسترخائية الأيونية نجاحاً محدوداً فقط.

إن الكيمياء المستخدمة لربط الليجاند المستهدف على سطح الجسيم، قد تؤثر بشكل مثير أيضاً على كفاءة عامل التباين النهائي. وفي بعض الحالات، قد يصبح موقع الارتباط النشط لليجاند مشغولاً أو محجوباً بعد الارتباط بالجسيم النانوي. ومن الواضح أن مثل هذه العوامل ستعطي نتائج تصوير جزيئي سيئة. وبالإضافة إلى ذلك، فإدماج فواصل بوليمر مرنة- مثل بولي إيثيلين جليكول- بين ليغاند الاستهداف و سطح الجسيمات النانوية؛ قد يُحسّن كفاءة ليغاند الاستهداف. وتسمح هذه "الحبال" المرنة بمدى أوسع من الحركة لليغاند الاستهداف؛ مما يزيد من احتمالية حدوث المواجهة، والترابط إلى الهدف محل الاهتمام.

وبالإضافة إلى عدد أيونات الجادولينيوم لكل جسيم، يجب أيضاً أن يكون عدد ليغاندات الاستهداف لكل جسيم، هو الأمثل. ويميل الجسيم النانوي بليغاندات ترابط عديدة- أي تكافؤ ليغاند عالٍ- إلى توفير عامل تباين أكثر فعالية. إن المزج بين تكافؤ الليغاند وآلفة الارتباط- أي الاجتذاب- يسمح بارتباط عامل التباين بسرعة، وبإصرار إلى العلامة الحيوية المقصودة. وعلى أية حال، فيمكن أن يؤدي دمج الكثير من ليغاندات الاستهداف على كل جسيم نانوي في بعض الحالات، إلى إعاقة فراغية تمنع الارتباط إلى الحاتمة المطلوبة. وقد يتداخل غطاء كثيف بإفراط من ليغاندات على سطح الجسيم مع الاسترخائية، من خلال عرقلة تفاعل الماء مع معقدات الجادولينيوم.



الشكل رقم (٩,١٠). النمذجة الرياضية لتركيز عامل التباين الأدنى اللازم للتصوير التشخيصي بزيادة الاسترخائية الأيونية r_1 . ترمز علامة النجمة (*) إلى الاسترخائية r_1 المستندة على الأيونية من الجسم النانوي المقترن بـ Gd-DTPA-BOA في كل من قوى المجال المغناطيسي ١.٥ تسلا و ٤.٧ تسلا. (أعيد طبعها بإذن من المرجع [176]).

٩,٥,٢ تحقيق الأمثلية لتقنيات التصوير بالرنين المغناطيسي

Optimization of MRI Techniques

عادة ما تستخدم مركبات بارامغناطيسية لزيادة استرخاء T_1 في التمييز بالتغاير لعوامل أكسيد الحديد، فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر USPIO، المصممة لزيادة استرخاء T_2^* للنسيج المستهدف. وعادة يتم تصور (رؤية) التأثير T_2^* المستخدم مع أكسيد الحديد فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر USPIOs، مثل نقص في كثافة صورة التصوير بالرنين المغناطيسي الموزون بـ T_2^* . وعلى أية حال، ستنجج العوامل البارامغناطيسية زيادة في إشارة النسيج عند مواجهتها مع التصوير بالرنين المغناطيسي الموزون بـ T_1 ؛ لذلك فإن تأثيرات تباين أكسيد الحديد فائق البارامغناطيسية، فائق

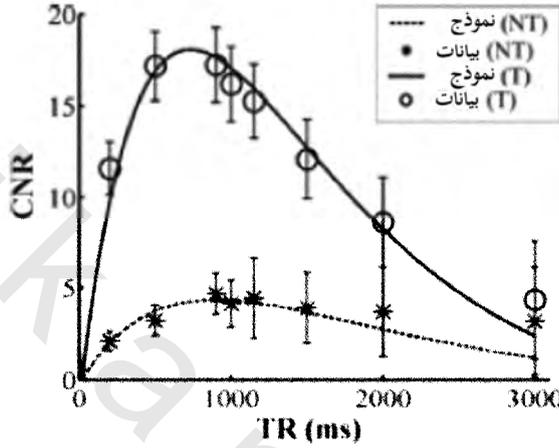
الصغر USPIO والعوامل المغناطيسية تكون مختلفة جداً، ويكون تتابع نبض التصوير بالرنين المغناطيسي والبارامترات متميزاً كذلك للطريقتين.

لقد فحصنا تأثير درجة وضوح التصوير بالرنين المغناطيسي على تحسين الإشارة الموزون بـ T_1 ، مع جسيمات نانوية مستهدفة الفيبرين. كما لاحظنا أن زيادة درجة الوضوح، تؤدي إلى زيادة تحسين الصورة؛ بسبب التخفيض في تخفيف الحجم الجزيئي [الشكل رقم ٩.٨ (ب)] [25]. وعلى أية حال، لا يمكن زيادة درجة وضوح الصورة إلى مالا نهاية؛ لأن زيادة درجة وضوح التصوير بالرنين المغناطيسي، تتطلب إما زيادة في أزمنة المسح، أو تخفيض الإشارة إلى الضوضاء؛ ولذلك يجب أن تكون نسبة الإشارة إلى الضوضاء، والتباين إلى الضوضاء متوازنة؛ من أجل تحقيق جودة صورة مقبولة، وتباين تشخيصي ضمن إطار زمن مسح سريري مقبول.

وبالإضافة إلى درجة وضوح الصورة، يعتمد تباين الصورة بشدة على زمن التكرار TR، المستخدم في تتابع المسح [78]. ونلاحظ على الصورة الموزونة بـ T_1 ، أن التباين بين نسيجين باستخدام أزمنة استرخاء T_1 مختلفة، يمكن أن يزداد بالتصوير عند القيمة المثلى لزمن التكرار TR (الشكل رقم ٩.١١) [76]. إن تعديل زمن التكرار TR بمقدار ٣٠٠-٤٠٠ ميلي ثانية، بعيداً عن القيمة المثلى، يمكن أن يخفّض نسبة التباين إلى الضوضاء بمقدار يصل إلى ٢٥٪ [76].

وكما هي الحال مع جسيمات أكسيد الحديد فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر USPIO، يجب السماح بدوران كافٍ؛ حتى تصل الجسيمات النانوية مستهدفة الليجاندا، وترتبط بالعلامة الجزيئية محل الاهتمام. ويمكن أن تتأثر الحركية الدوائية والديناميكا الدوائية بكيمياء السطح، والاستقرار داخل الجسم، والحجم، والبيئة البيولوجية. والزمن اللازم لتشبع هدف كيميائي حيوي وعائي، سهل الوصول إليه،

خلال زمن يتراوح من ساعتين إلى ثلاث ساعات، وهو يعكس الزمن اللازم لإكمال دورة مرور كاملة من الدم خلال طبقة الأوعية الدموية البعيدة.

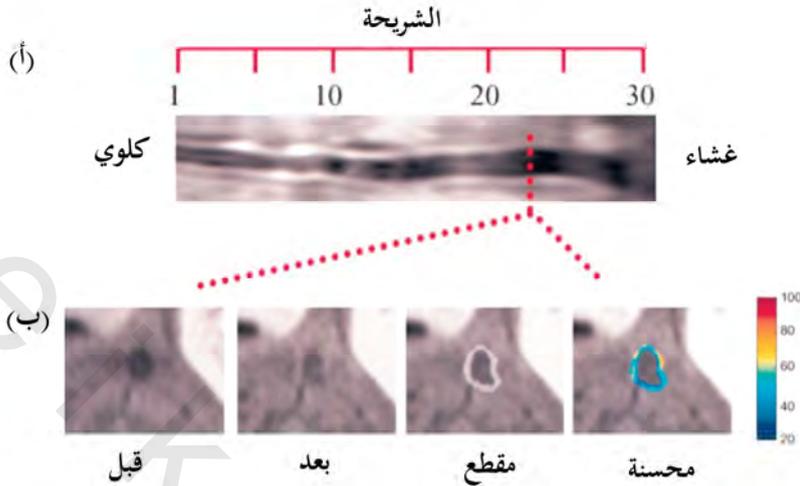


الشكل رقم (٩، ١١). نسب التباين إلى الضوضاء النظرية والفعالية CNRs، التي تم الحصول عليها من خلايا العضلات الملساء بأزمنة تكرار مختلفة TR. تعرض الخلايا المعالجة بجسيمات نانوية مستهدفة T، نسبة التباين إلى الضوضاء CNR أعلى بكثير بالمقارنة مع الجسيمات غير المستهدفة NT. وتصل نسب التباين إلى الضوضاء النظرية والفعالية CNRs إلى الحد الأقصى عند بعض القيم المثلى من TR. (أعيد طبعها بإذن من المرجع [76]).

ويمكن تخفيض زمن الوصول إلى الإشارة القسوى، بزيادة كمية عامل التباين المحقونة، ولكن يتم تحديد الجرعة نموذجياً إلى الجرعة الفعالة الدنيا. وعموماً تحقن ٠,٥-١,٠ مل كجم^{-١} للتجارب الحيوانية، وهي أقل بكثير من المقدار اللازم لتوليد إشارة تجمع دموي معتبرة [70]. ويجنبنا هذا الأسئلة العالقة عما إذا كان التباين مستهدفاً إلى / أو يدور خلال المنطقة محل الاهتمام. كما يمكن أن تكون مثل هذه القضايا المحيرة مزعجة، وخاصة للعوامل بكثافة إشارة عالية، و/أو لعمر النصف المطول. إن

التأثيرات المثيرة لتركيب الجسيم والكيمياء على حركية الإزالة (النزع)، وبروتوكول التصوير الناتج، يمكن رؤيتها بمقارنة النقاط الزمنية للتصوير الأمثل لثلاثة عوامل تباين مختلفة إلى حد كبير. إن الجسيمات النانوية مستهدفة $\alpha_v\beta_3$ -الانتجرين، تعطي تحسين إشارة تصوير بالرنين المغناطيسي بشكل بارز بعد ساعتين من الحقن [70]، مقارنة بـ ٢٤ ساعة لعامل الليوسوم [79]، و٣٦ ساعة لمعقد DTPA-الأفيدين [80].

بينما تتابعات تصوير الدم اللامع مفضلة؛ للتمييز بين تأثيرات التباين السلبي لتراكم أكسيد الحديد فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر USPIO، فإن تقنيات الدم الأسود، هي المناسبة أكثر لرؤية إشارة التصوير بالرنين المغناطيسي المحسنة، الناجمة عن جسيمات نانوية بارامغناطيسية مستهدفة (الشكل رقم ٩،١٢) [33]. وعلى سبيل المثال، تتضمن إحدى طرائق التصوير بالرنين المغناطيسي بالدم الأسود جمع صور مقطعية لوعاء دموي، ووضع نطاقات مشبعة على جانبي مستوى التصوير الحالي. وتقوم هذه النطاقات المشبعة بإلغاء جميع إشارات التصوير بالرنين المغناطيسي على جانبي الشريحة المصورة، بما في ذلك إشارة الدم. ويتم إدراج تأخير قصير بين تطبيق نطاقات التشبع وجمع بيانات الصورة؛ مما يسمح للدم المشبع بالتدفق إلى الشريحة المصورة، والتي لن تقدم أي إشارة. وبوضع نطاقات تشبع على جانبي الشريحة الحالية، يظهر كل من الدم الشرياني والوريدي أسود على الصورة النهائية. وكما هي الحال مع التصوير بأكسيد الحديد فائق البارامغناطيسية، فائق الصغر USPIO، فإن صانع الإزاحة الكيميائية من الدهن، يمكن أن يحجب رؤية جدار الوعاء الدموي؛ ولذلك تستخدم في أغلب الأحيان تقنيات إخماد الدهون من أجل إلغاء إشارة الدهن، وتوفير تحديد واضح لتشريح جدار الوعاء الدموي (الشكل رقم ٩،١٢) [33].



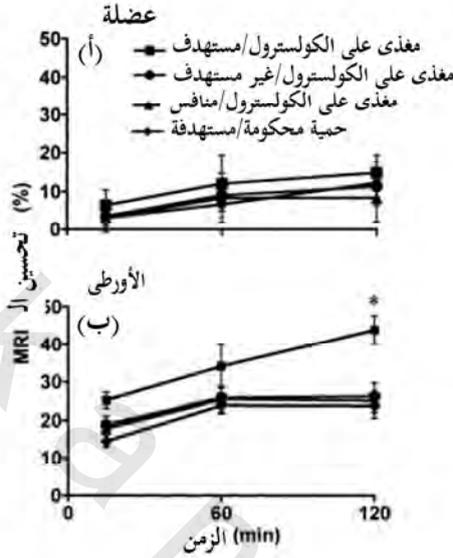
الشكل رقم (٩،١٢)، (أ) تصوير الدم الأسود مخمد الدهن داخل الجسم لشريان الأورطي البطني لأرنب، من الشرايين الكلوية إلى الحجاب الحاجز. (ب) صور مستعرضة قبل العلاج وبعده، وبعد التقسيم شبه الآلي (مقطع Segmented)، وبإشارة مميزة بألوان محسنة بنسبة مئوية (تحسين). ويتيح إخماد الدهن والتصوير بالدم الأسود تمييز الجدار الشرياني لتجويف الوعاء، والنسيج الدهني المحيط. (أعيد طبعها بإذن من المرجع [33]).

٩،٥،٣ التصوير الجزيئي لنمو (لتكوّن) الأوعية الدموية الجديدة داخل الجسم

In Vivo Molecular Imaging of Angiogenesis

يعتمد التحقق من فعالية عامل تباين التصوير الجزيئي أساساً على التعزيز بين تحسين إشارة التصوير بالرنين المغناطيسي، والصبغ النسيجي للحاتمة المستهدفة. وتم كشف التعديل الوعائي من $\alpha_v\beta_3$ -انتجرين بالصبغ النسيجي الموضعي المختلط من $\alpha_v\beta_3$ -انتجرين وال PECAM، وعلامة وعائية معمة. وتم ملاحظة هذه السمة الكيميائية الحيوية على نطاق واسع في أجزاء نسيجية لأرانب مغذاة على الكولسترول، ولكن تم اكتشافه بشكل متناثر أكثر بكثير في حيوانات تعيش على حمية متحكم فيها (الشكل رقم ٩،١٣) [33]. وبالمثل لوحظ على نحو واسع تحسين إشارة التصوير بالرنين

للعواء، مقابل الاستهداف النشط للحاتمة الكيميائية الحيوية محل الاهتمام (الشكل رقم ٩،١٤) [33].

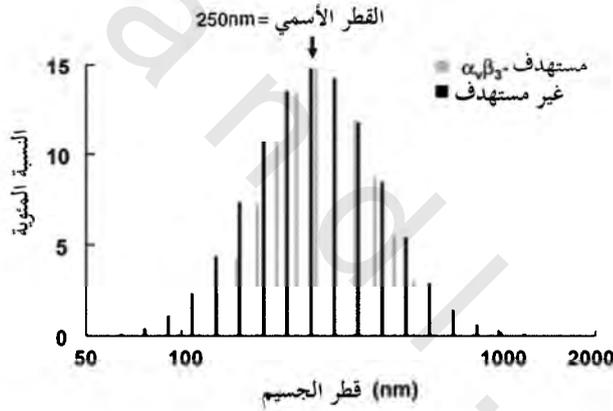


الشكل رقم (٩،١٤). (أ) التحليل الكمي لتحسين إشارة التصوير بالرنين المغناطيسي (نسبة مئوية) من الشريان الأورطي. (ب) العضلات الهيكلية بعد المعالجة بجسيمات نانوية مستهدفة وغير مستهدفة $\alpha_v\beta_3$ -الإنترجرين في مجموعات مغذاة على الكوليسترول، أو على حمية متحكم فيها. $P > 0.05$ ، للمغذاة على الكوليسترول/المستهدفة، مقابل كل المجموعات الأخرى. (أعيد طبعها بإذن من المرجع [33]).

وعلى أية حال، قد تؤدي الاختلافات في حجم الجسيمات إلى اختلافات في تحسين إشارة التصوير بالرنين المغناطيسي بين الجسيمات النانوية المستهدفة وغير المستهدفة؛ ولذلك يجب أن تكون توزيعات حجم الجسيمات لكلتا الصياغتين متطابقة (الشكل رقم ٩،١٥) [33].

كما يمكن تحقيق التأكيد الآخر لاستهداف الجسيم النشط بإجراءات المنافسة داخل الجسم (الشكل رقم ٩،١٤) [33]. ويتم حقن جسيمات نانوية عالية الاجتذاب

مستهدفة، تفتقر إلى المخليبية البارامغناطيسية، لكي تشغل جميع مواقع الارتباط المتوفرة، ولكنها لا تقدم تحسين إشارة التصوير بالرنين المغناطيسي. إن الحقن التالي لجسيمات نانوية بارامغناطيسية مستهدفة، سينتج تحسين الصورة فقط خلال تراكم الجسيم غير الفعال (السلبى). ويوفر تحليل تحسين إشارة الرنين المغناطيسي في الحيوانات التجريبية المتحكم فيها- مثل أرانب بنظام غذائي متحكم فيه، بالإضافة إلى الأنسجة المتحكم فيها، مثل العضلات الهيكلية- تمييزاً أكبر بين قدرة الجسيم على استهداف الحاتمة - محل الاهتمام- بشكل نشط، والتراكم السلبى من العامل (الشكل رقم ٩،١٤) [33].



الشكل رقم (٩،١٥). توزيع حجم الجسيم لجسيمات نانوية $\alpha_v\beta_3$ -الانتجرين مستهدفة (باللون الرمادي)، وغير المستهدفة (باللون الأسود)، توضح تطابق الخواص الفيزيائية للصياغتين. (أعيد طبعها بإذن من المرجع [70]).

وبطريقة مماثلة، عرضنا أيضاً التصوير الجزيئي لنشوء الأوعية الدموية في أورام Vx2 وليدة، زرعت في الأطراف الخلفية للأرانب [70]. والتعزيز بين تحسين إشارة التصوير بالرنين المغناطيسي والصبغ النسيجي من تعديل $\alpha_v\beta_3$ -الانتجرين الوعائي،

يعيد تأكيد حساسية الجسيمات النانوية المستهدفة- $\alpha_v\beta_3$. كما أن مقارنة كمية تحسين إشارة التصوير بالرنين المغناطيسي المنجزة بجسيمات نانوية مستهدفة، مقابل غير المستهدفة، أو صياغات منافسة؛ توفر مزيداً من الأدلة الداعمة لخصوصية عامل تباين التصوير الجزيئي الخاص بنا. وبالإضافة إلى ذلك، فلقد وضحنا أن بعض الكتل التي تظهر على أنها ورم فعال في التصوير بالرنين المغناطيسي الموزون بـ T_2 ، ثبت أنها كانت فقط عبارة عن بقايا ورم بالأنسجة، وتتكون في أغلبها من الخلايا الالتهابية. ولم تعرض هذه الكتل تحسين التصوير بالرنين المغناطيسي مع جسيمات نانوية مستهدفة- $\alpha_v\beta_3$ ؛ مما يثبت أكثر خصوصية هذه الطرائق بالنسبة للتصوير الجزيئي لنشوء الأوعية الدموية النشطة.

٩,٦ الاستنتاجات Conclusions

إن التصوير الخلوي والجزيئي يمثل نموذجاً تشخيصياً سريعاً واعدداً، يمكن أن يغير من ممارسة الطب في غضون العقد المقبل. ويعاني توصيف المرض اليوم بأقسام فحص عينة نسيجية من أخطاء مستحثة خلال العينة المحدودة، والتي قد تفشل في تمييز المدى الكامل بشكل ملائم وشدة المرض. وعلى أية حال، فيمكن أن يطور التمثيل ثلاثي الأبعاد لعملية المرض بالتصوير غير الانتشاري؛ مما يؤدي إلى التصوير المحسّن للمرض. كما تقدم هذه الطرائق بشكل واضح فرصة هائلة لاكتشاف المرض وعلاجه مبكراً. ويمكن أن تأخذ عوامل التصوير المستهدفة عدداً من الأشكال، وتستخدم تشكيلة متنوعة من ليجانندات موجهة العودة، ومتوافقة مع شروط طرائق التصوير المختلفة. وكل هذه الخصائص يمكن أن تُحسّن في النهاية أو تقلل الكفاءة الكلية لعامل التباين النهائي؛ ولذلك يجب اختبار كل مكون بعناية، وجعله أمثل للاستخدام

السريري. ومن الواضح أن نجاح عوامل التصوير الجزيئي لديها القدرة على تغيير الممارسة المستقبلية للطب، حينما تصل هذه التقنيات إلى العيادة.

إن مجالات التصوير الخلوي والجزيئي وتقنيات النانو المرتبطة، سرعان ما تتطور وتغير باستمرار. ويجب أن يتواصل التقدم السريع في العلوم الجينية والبروتينية سويًا، مع التقدم في البحوث الجزيئية والخلوية الأساسية؛ لكشف الأهداف الجزيئية الجديدة والمفيدة. كما من المتوقع أن تؤدي الجهود في هذه التخصصات في النهاية إلى تطوير مؤشرات حيوية جديدة للمرض، وتُعيّن نقاط النهاية للدراسات العلاجية.

المراجع References

- 1 S. H. Britz-Cunningham, S. J. Adelstein, Molecular targeting with radionuclides: state of the science. *J. Nucl. Med.* 2003, 44, 1945–1961.
- 2 H. R. Herschman, Molecular imaging: looking at problems, seeing solutions. *Science* 2003, 302, 605–608.
- 3 R. Y. Tsien, Imagining imaging's future. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003, Suppl. pp. 16–21.
- 4 Lanza GM, Wickline SA. Targeted ultrasonic contrast agents for molecular imaging and therapy. *Curr. Probl. Cardiol.* 2003, 28, 625–653.
- 5 S. A. Wickline, G. M. Lanza, Molecular imaging, targeted therapeutics, and nanoscience. *J. Cell Biochem. Suppl.* 2002, 39, 90–97.
- 6 S. A. Wickline, G. M. Lanza, Nanotechnology for molecular imaging and targeted therapy. *Circulation* 2003, 107, 1092–1095.
- 7 L. Kostakoglu, H. Agress, S. J. Goldsmith Jr., Clinical role of FDG PET in evaluation of cancer patients. *Radiographics* 2003, 23, 315–40; quiz 533.
- 8 K. Herholz, PET studies in dementia. *Ann. Nucl. Med.* 2003, 17, 79–89.
- 9 D. Kwekkeboom, E. P. Krenning, M. de Jong, Peptide receptor imaging and therapy. *J. Nucl. Med.* 2000, 41, 1704–1713.
- 10 F. G. Blankenberg, H. W. Strauss, Noninvasive strategies to image cardiovascular apoptosis. *Cardiol. Clin.* 2001, 19, 165–172, x.
- 11 F. M. Bengel, M. Anton, N. Avril, T. Brill, N. Nguyen, R. Haubner, E. Gleiter, B. Gansbacher, M. Schwaiger, Uptake of radiolabeled 2 β -fluoro-2 β -deoxy-5-iodo-1-beta-d-arabinofuranosyluracil in cardiac cells after adenoviral transfer of the herpesvirus thymidine kinase gene: the cellular basis for cardiac gene imaging. *Circulation* 2000, 102, 948–950.
- 12 G. M. Lanza, K. D. Wallace, M. J. Scott, W. P. Cacheris, D. R. Abendschein, D. H. Christy, A. M. Sharkey, J. G. Miller, P. J. Gaffney, S. A. Wickline, A novel

- site-targeted ultrasonic contrast agent with broad biomedical application. *Circulation* 1996, 94, 3334–3340.
- 13 G. M. Lanza, K. D. Wallace, S. E. Fischer, D. H. Christy, M. J. Scott, R. L. Trousil, W. P. Cacheris, J. G. Miller, P. J. Gaffney, S. A. Wickline, High-frequency ultrasonic detection of thrombi with a targeted contrast system. *Ultrasound Med. Biol.* 1997, 23, 863–870.
 - 14 G. M. Lanza, R. L. Trousil, K. D. Wallace, J. H. Rose, C. S. Hall, M. J. Scott, J. G. Miller, P. R. Eisenberg, P. J. Gaffney, S. A. Wickline, In vitro characterization of a novel, tissue-targeted ultrasonic contrast system with acoustic microscopy. *J. Acoust. Soc. Am.* 1998, 104, 3665–3672.
 - 15 G. M. Lanza, D. R. Abendschein, C. S. Hall, J. N. Marsh, M. J. Scott, D. E. Scherrer, S. A. Wickline, Molecular imaging of stretch-induced tissue factor expression in carotid arteries with intravascular ultrasound. *Invest. Radiol.* 2000, 35, 227–234.
 - 16 G. M. Lanza, D. R. Abendschein, C. S. Hall, M. J. Scott, D. E. Scherrer, A. Houseman, J. G. Miller, S. A. Wickline. In vivo molecular imaging of stretch-induced tissue factor in carotid arteries with ligand-targeted nanoparticles. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 2000, 13, 608–614.
 - 17 A. L. Klibanov, M. S. Hughes, J. N. Marsh, C. S. Hall, J. G. Miller, J. H. Wible, G. H. Brandenburger, Targeting of ultrasound contrast material. An in vitro feasibility study. *Acta Radiol. Suppl.* 1997, 412, 113–120.
 - 18 E. C. Unger, T. P. McCreery, R. H. Sweitzer, D. Shen, G. Wu, In vitro studies of a new thrombus-specific ultrasound contrast agent. *Am. J. Cardiol.* 1998, 81, 58G–61G.
 - 19 S. M. Demos, H. Onyuksel, J. Gilbert, S. I. Roth, B. Kane, P. Jungblut, J. V. Pinto, D. D. McPherson, M. E. Klegerman, In vitro targeting of antibody-conjugated echogenic liposomes for site-specific ultrasonic image enhancement. *J. Pharm. Sci.* 1997, 86, 167–171.
 - 20 S. M. Demos, H. Alkan-Onyuksel, B. J. Kane, K. Ramani, A. Nagaraj, R. Greene, M. Klegerman, D. D. McPherson, In vivo targeting of acoustically reflective liposomes for intravascular and transvascular ultrasonic enhancement. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1999, 33, 867–875.
 - 21 M. Takeuchi, K. Ognyankin, N. G. Pandian, T. P. McCreery, R. H. Sweitzer, V. E. Caldwell, E. C. Unger, E. Avelar, M. Sheahan, R. Connolly, Enhanced visualization of intravascular and left atrial appendage thrombus with the use of a thrombus-targeting ultrasonographic contrast agent (MRX-408A1): in vivo experimental echocardiographic studies. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 1999, 12, 1015–1021.
 - 22 H. Gupta, R. Weissleder, Targeted contrast agents in MR imaging. *Magn. Reson. Imaging Clin. North Am.* 1996, 4, 171–184.
 - 23 R. Weissleder, Molecular imaging: exploring the next frontier. *Radiology* 1999, 212, 609–614.
 - 24 D. Artemov, Molecular magnetic resonance imaging with targeted contrast agents. *J. Cell Biochem.* 2003, 90, 518–524.

- 25 S. Flacke, S. Fischer, M. J. Scott, R. J. Fuhrhop, J. S. Allen, M. McLean, P. Winter, G. A. Sicard, P. J. Gaffney, S. A. Wickline, G. M. Lanza, Novel MRI contrast agent for molecular imaging of fibrin: implications for detecting vulnerable plaques. *Circulation* 2001, 104, 1280–1285.
- 26 G. M. Lanza, C. H. Lorenz, S. E. Fischer, M. J. Scott, W. P. Cacheris, R. J. Kaufmann, P. J. Gaffney, S. A. Wickline, Enhanced detection of thrombi with a novel fibrin-targeted magnetic resonance imaging agent. *Acad. Radiol.* 1998, 5 Suppl 1, S173–6; discussion S183–184.
- 27 P. M. Winter, S. D. Caruthers, X. Yu, S. K. Song, J. Chen, B. Miller, J. W. Bulte, J. D. Robertson, P. J. Gaffney, S. A. Wickline, G. M. Lanza. Improved molecular imaging contrast agent for detection of human thrombus. *Magn. Reson. Med.* 2003, 50, 411–416.
- 28 X. Yu, S. K. Song, J. Chen, M. J. Scott, R. J. Fuhrhop, C. S. Hall, P. J. Gaffney, S. A. Wickline, G. M. Lanza, High-resolution MRI characterization of human thrombus using a novel fibrin-targeted paramagnetic nanoparticle contrast agent. *Magn. Reson. Med.* 2000, 44, 867–872.
- 29 H. W. Kang, L. Josephson, A. Petrovsky, R. Weissleder, A. Bogdanov Jr., Magnetic resonance imaging of inducible E-selectin expression in human endothelial cell culture. *Bioconjug. Chem.* 2002, 13, 122–127.
- 30 S. D. Tiukinhoy, M. E. Mahowald, V. P. Shively, A. Nagaraj, B. J. Kane, M. E. Klegerman, R. C. MacDonald, D. D. McPherson, J. S. Matsumura, Development of echogenic, plasmid-incorporated, tissue-targeted cationic liposomes that can be used for directed gene delivery. *Invest. Radiol.* 2000, 35, 732–738.
- 31 J. R. Lindner, J. Song, J. Christiansen, A. L. Klibanov, F. Xu, K. Ley, Ultrasound assessment of inflammation and renal tissue injury with microbubbles targeted to P-selectin. *Circulation* 2001, 104, 2107–2112.
- 32 J. Chen, C. H. Tung, U. Mahmood, V. Ntziachristos, R. Gyurko, M. C. Fishman, P. L. Huang, R. Weissleder, In vivo imaging of proteolytic activity in atherosclerosis. *Circulation* 2002, 105, 2766–2771.
- 33 P. M. Winter, A. M. Morawski, S. D. Caruthers, R. W. Fuhrhop, H. Zhang, T. A. Williams, J. S. Allen, E. K. Lacy, J. D. Robertson, G. M. Lanza, S. A. Wickline, Molecular imaging of angiogenesis in early stage atherosclerosis with amb3-integrin-targeted nanoparticles. *Circulation* 2003, 108, 2270–2274.
- 34 Z. J. Zheng, J. B. Croft, W. H. Giles, G. A. Mensah, Sudden cardiac death in the United States, 1989 to 1998. *Circulation* 2001, 104, 2158–2163.
- 35 C. Napoli, C. K. Glass, J. L. Witztum, R. Deutsch, F. P. D'Armiento, W. Palinski, Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: Fate of Early Lesions in Children (FELIC) study. *Lancet* 1999, 354, 1234–1241.
- 36 A. W. Zieske, G. T. Malcom, J. P. Strong, Natural history and risk factors of atherosclerosis in children and youth: the PDAY study. *Pediatr. Pathol. Mol. Med.* 2002, 21, 213–237.

- 37 M. J. Davies, A. C. Thomas, Plaque fissuring – the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendoangina. *Br. Heart J.* 1985, 53, 363–373.
- 38 M. J. Davies, D. M. Krikler, D. Katz, Atherosclerosis: inhibition of regression as therapeutic possibilities. *Br. Heart J.* 1991, 65, 302–310.
- 39 P. D. Richardson, M. J. Davies, G. V. Born, Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet* 1989, 2, 941–944.
- 40 M. Naghavi, P. Libby, E. Falk, S. W. Casscells, S. Litovsky, J. Rumberger, J. J. Badimon, C. Stefanadis, P. Moreno, G. Pasterkamp, Z. Fayad, P. H. Stone, S. Waxman, P. Raggi, M. Madjid, A. Zarrabi, A. Burke, C. Yuan, P. J. Fitzgerald, D. S. Siscovick, C. L. de Korte, M. Aikawa, K. E. Juhani Airaksinen, G. Assmann, C. R. Becker, J. H. Chesebro, A. Farb, Z. S. Galis, C. Jackson, I. K. Jang, W. Koenig, R. A. Lodder, K. March, J. Demirovic, M. Navab, S. G. Priori, M. D. Reikher, R. Bahr, S. M. Grundy, R. Mehran, A. Colombo, E. Boerwinkle, C. Ballantyne, W. Insull Jr., R. S. Schwartz, R. Vogel, P. W. Serruys, G. K. Hansson, D. P. Faxon, S. Kaul, H. Drexler, P. Greenland, J. E. Muller, R. Virmani, P. M. Ridker, D. P. Zipes, P. K. Shah, J. T. Willerson, From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* 2003, 108, 1664–1672.
- 41 S. Ojio, H. Takatsu, T. Tanaka, K. Ueno, K. Yokoya, T. Matsubara, T. Suzuki, S. Watanabe, N. Morita, M. Kawasaki, T. Nagano, I. Nishio, K. Sakai, K. Nishigaki, G. Takemura, T. Noda, S. Minatoguchi, H. Fujiwara, Considerable time from the onset of plaque rupture and/or thrombi until the onset of acute myocardial infarction in humans: coronary angiographic findings within 1 week before the onset of infarction. *Circulation* 2000, 102, 2063–2069.
- 42 L. H. Arroyo, R. T. Lee. Mechanisms of plaque rupture: mechanical and biologic interactions. *Cardiovasc. Res.* 1999, 41, 369–375.
- 43 L. Petit, P. Lesnik, C. Dachet, M. Moreau, M. J. Chapman, Tissue factor pathway inhibitor is expressed by human monocyte-derived macrophages: relationship to tissue factor induction by cholesterol and oxidized LDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999, 19, 309–315.
- 44 M. M. Kockx, G. R. De Meyer, N. Buysens, M. W. Knaapen, H. Bult, A. G. Herman, Cell composition, replication, and apoptosis in atherosclerotic plaques after 6 months of cholesterol withdrawal. *Circ. Res.* 1998, 83, 378–387.
- 45 A. C. Newby, A. B. Zaltsman, Fibrous cap formation or destruction – the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc. Res.* 1999, 41, 345–360.
- 46 P. K. Shah, Role of inflammation and metalloproteinases in plaque disruption and thrombosis. *Vasc. Med.* 1998, 3, 199–206.
- 47 P. Libby, Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995, 91, 2844–2850.
- 48 M. J. McCarthy, I. M. Loftus, M. M. Thompson, L. Jones, N. J. London, P. R. Bell, A. R. Naylor, N. P. Brindle, Angiogenesis and the atherosclerotic carotid

- plaque: an association between symptomatology and plaque morphology. *J. Vasc. Surg.* 1999, 30, 261–268.
- 49 O. J. de Boer, A. C. van der Wal, P. Teeling, A. E. Becker, Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization? *Cardiovasc. Res.* 1999, 41, 443–449.
- 50 C. M. Ballantyne, Clinical trial endpoints: angiograms, events, and plaque instability. *Am. J. Cardiol.* 1998, 82, 5M–11M.
- 51 K. Yokoya, H. Takatsu, T. Suzuki, H. Hosokawa, S. Ojio, T. Matsubara, T. Tanaka, S. Watanabe, N. Morita, K. Nishigaki, G. Takemura, T. Noda, S. Minatoguchi, H. Fujiwara, Process of progression of coronary artery lesions from mild or moderate stenosis to moderate or severe stenosis: a study based on four serial coronary arteriograms per year. *Circulation* 1999, 100, 903–909.
- 52 J. A. Ambrose, M. A. Tannenbaum, D. Alexopoulos, C. E. Hjendahl-Monsen, J. Leavy, M. Weiss, S. Borrico, R. Gorlin, V. Fuster, Angiographic progression of coronary artery disease and the development of myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1988, 12, 56–62.
- 53 P. Winter, N. Bansal, Magnetic resonance, general medical. In: Meyers RA, ed. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory, and Instrumentation*. Chichester; New York: Wiley; 2000:201–236.
- 54 S. C. Bushong, Magnetic Resonance Imaging: Physical and Biological Principles, 2nd ed. St. Louis: Mosby; 1996.
- 55 F. H. Epstein, J. R. Brookeman, Physics of MRI – basic principles. In: A. Lardo, Z. Fayad, N. A. F. Chronos, V. Fuster, eds. *Cardiovascular magnetic resonance: established and emerging applications*. New York: *Martin Dunitz*; 2003:1–15.
- 56 R. M. Weisskoff, P. Caravan, MR contrast agent basics. In: A. Lardo, Z. Fayad, N. A. F. Chronos, V. Fuster, eds. *Cardiovascular magnetic resonance: established and emerging applications*. New York: *Martin Dunitz*; 2003:17–38.
- 57 Y. X. Wang, S. M. Hussain, G. P. Krestin, Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur. Radiol.* 2001, 11, 2319–2331.
- 58 H. J. Weinmann, W. Ebert, B. Misselwitz, H. Schmitt-Willich, Tissue-specific MR contrast agents. *Eur. J. Radiol.* 2003, 46, 33–44.
- 59 J. W. Bulte, I. D. Duncan, J. A. Frank, In vivo magnetic resonance tracking of magnetically labeled cells after transplantation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002, 22, 899–907.
- 60 S. A. Schmitz, M. Taupitz, S. Wagner, K. J. Wolf, D. Beyersdorff, B. Hamm, Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaques using superparamagnetic iron oxide particles. *J. Magn. Reson. Imaging* 2001, 14, 355–361.
- 61 M. E. Kooi, V. C. Cappendijk, K. B. Cleutjens, A. G. Kessels, P. J. Kitslaar, M. Borgers, P. M. Frederik, M. J. Daemen, J. M. van Engelshoven, Accumulation of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in human atherosclerotic plaques can be detected by in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003, 107, 2453–2458.

- 62 S. A. Schmitz, S. E. Coupland, R. Gust, S. Winterhalter, S. Wagner, M. Kresse, W. Semmler, K. J. Wolf, Superparamagnetic iron oxide-enhanced MRI of atherosclerotic plaques in Watanabe hereditary hyperlipidemic rabbits. *Invest. Radiol.* 2000, 35, 460–471.
- 63 P. Constantinides, Plaque fissuring in human coronary thrombosis. *J. Atheroscler. Res.* 1966, 6, 1–17.
- 64 L. Oltrona, C. M. Speidel, D. Recchia, S. A. Wickline, P. R. Eisenberg, D. R. Abendschein, Inhibition of tissue factor-mediated coagulation markedly attenuates stenosis after balloon-induced arterial injury in minipigs. *Circulation* 1997, 96, 646–652.
- 65 J. S. Kerr, S. A. Mousa, A. M. Slee, amb3-Integrin in angiogenesis and restenosis. *Drug News Perspect.* 2001, 14, 143–150.
- 66 G. G. Bishop, J. A. McPherson, J. M. Sanders, S. E. Hesselbacher, M. J. Feldman, C. A. McNamara, L. W. Gimple, E. R. Powers, S. A. Mousa, I. J. Sarembock, Selective amb3-receptor blockade reduces macrophage infiltration and restenosis after balloon angioplasty in the atherosclerotic rabbit. *Circulation* 2001, 103, 1906–1911.
- 67 M. H. Corjay, S. M. Diamond, K. L. Schlingmann, S. K. Gibbs, J. K. Stoltenborg, A. L. Racanelli, amb3, amb5, and osteopontin are coordinately upregulated at early time points in a rabbit model of neointima formation. *J. Cell Biochem.* 1999, 75, 492–504.
- 68 P. C. Brooks, S. Stromblad, R. Klemke, D. Visscher, F. H. Sarkar, D. A. Cheresh, Antiintegrin amb3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J. Clin. Invest.* 1995, 96, 1815–1822.
- 69 S. A. Anderson, R. K. Rader, W. F. Westlin, C. Null, D. Jackson, G. M. Lanza, S. A. Wickline, J. J. Kotyk, Magnetic resonance contrast enhancement of neovasculature with amb3-targeted nanoparticles. *Magn. Reson. Med.* 2000, 44, 433–539.
- 70 P. M. Winter, S. D. Caruthers, A. Kassner, T. D. Harris, L. K. Chinen, J. S. Allen, E. K. Lacy, H. Zhang, J. D. Robertson, S. A. Wickline, G. M. Lanza, Molecular imaging of angiogenesis in nascent Vx-2 rabbit tumors using a novel amb3-targeted nanoparticle and 1.5 tesla magnetic resonance imaging. *Cancer Res.* 2003, 63, 5838–5843.
- 71 A. N. Tenaglia, K. G. Peters, M. H. Sketch Jr., B. H. Annex, Neovascularization in atherectomy specimens from patients with unstable angina: implications for pathogenesis of unstable angina. *Am. Heart J.* 1998, 135, 10–14.
- 72 Y. Zhang, W. J. Cliff, G. I. Schoefl, G. Higgins, Immunohistochemical study of intimal microvessels in coronary atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* 1993, 143, 164–172.
- 73 K. S. Moulton, K. Vakili, D. Zurakowski, M. Soliman, C. Butterfield, E. Sylvan, K. M. Lo, S. Gillies, K. Javaherian, J. Folkman, Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003, 100, 4736–4741.

- 74 W. Cacheris, T. Richard, R. Grabiak, A. Lee, Paramagnetic complexes of N-alkyl-N-hydroxylamides of organic acids and emulsions containing same for magnetic resonance imaging. *United States: HemaGen/PFC*; 1997.
- 75 C. W. Grant, S. Karlik, E. Florio, A liposomal MRI contrast agent: phosphatidylethanolamine- DTPA. *Magn. Reson. Med.* 1989, 11, 236–243.
- 76 A. M. Morawski, P. M. Winter, K. C. Crowder, S. D. Caruthers, R. W. Fuhrhop, M. J. Scott, J. D. Robertson, D. R. Abendschein, G. M. Lanza, S. A. Wickline, Targeted nanoparticles for quantitative imaging of sparse molecular epitopes with MRI. *Magn. Reson. Med.* 2004, 51, 480–486.
- 77 T. M. Button, R. J. Fiel, Isointense model for the evaluation of tumor-specific MRI contrast agents. *Magn. Reson. Imaging* 1988, 6, 275–280.
- 78 E. T. Ahrens, U. Rothbacher, R. E. Jacobs, S. E. Fraser, A model for MRI contrast enhancement using T1 agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998, 95, 8443–8448.
- 79 D. A. Sipkins, D. A. Cheresch, M. R. Kazemi, L. M. Nevin, M. D. Bednarski, K. C. Li, Detection of tumor angiogenesis in vivo by amb3–targeted magnetic resonance imaging. *Nat. Med.* 1998, 4, 623–626.
- 80 D. Artemov, N. Mori, R. Ravi, Z. M. Bhujwalla, Magnetic resonance molecular imaging of the HER-2/neu receptor. *Cancer Res.* 2003, 63, 2723–2727.