الفصل الرابع

التشخيصات والمسح عالي الدفق
Diagnostics and High Throughput Screening

أولاً:مسح الدفق العالي وأدوات التقانة النانوية للطب الحيوي
High Throughput Screening and Nanotechnology Tools for Biomedicine

أ) تعريف مسح الدفق العالي Definition of High Throughput Screening

لقد أصبحت البيولوجيا الجزيئية أداة متداولة للبحث في مجال الطب، وخاصة حيث تجري الأبحاث لتقصي العلاقة بين الخلل الوظيفي الخلوي، والمرض وطرق العلاج من جهة مع الخلل على المستوى الجزيئي من جهة أخرى.إن التنوع الهائل للجزيئات الحيوية وتعقدها كما وتفرد الشكل الجزيئي لكل فرد (وراثياً أو من حيث الكيمياء الحيوية) يجعل من هذه التقصيات أمراً فائق التعقيد.إن المسح العالمي للأنواع الجزيئية كافة لمتعضي أو خلية ما هو مهمة مستحيلة بالوسائل البيولوجية التقليدية والتي يجري فيها تحليل لمكون واحد مختار بنفس الوقت.في الواقع إذا أخذنا بعين الاعتبار الأمراض وأسبابها، فإن بعض المسوحات المعينة قد تؤدي إلى نتائج كاذبة بما أنه هناك أكثر من عامل جزيئي حيوي متورط – بنفس الوقت أو بشكل متتابع– في تطوير معظم الأمراض.

شجع هذا الوضع باحثين من اختصاصات مختلفة على التعاون من أجل تطوير وسيلة تحليلية عالمية تسمح بتقصي أعداد كبيرة من العينات المجموعة لأهداف بيولوجية من أجل التعرف بدقة على مواد كيميائية فعالة.مسح الدفق العالي (High throughput screening HTPS) كما نعرفه اليوم من بداية مايسمى "بالعصر الجزيئي" للطب الحيوي هو من تداعيات أو نتائج هذا التطور.

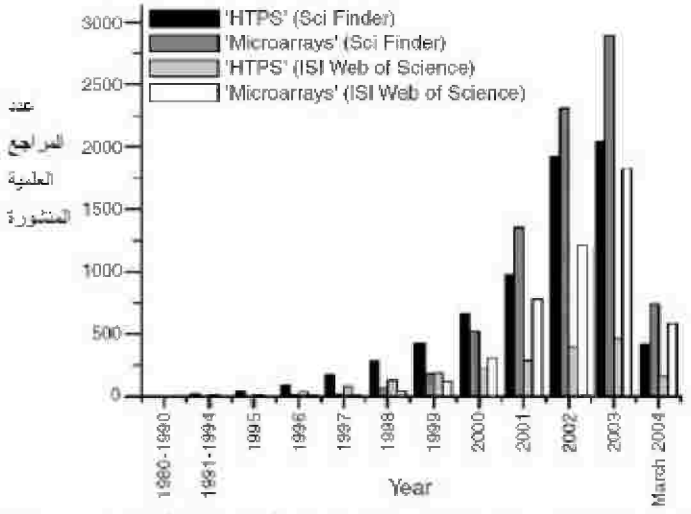
يجب أن تحقق وسائل مسح الدفق العالي مواصفات معينة؛ لتكون مفيدة في مخابر البحث والتشخيص.يجب أن تكون هذه الوسائل قادرة على أداء عدد واسع من المعايرات بسرعة وبوقت واحد بطريقة سهلة للمستخدم، وذات تصميم أو حجم صغير.يجب أن يتم تشكيل هذه الوسائل لتؤمن نتائج قابلة للإعادة وثابتة، والتي تسمح بمقارنة التجارب المجراة في مخابر مختلفة، ووضع معايير لهذه التجارب؛لأن العينات والكواشف البيولوجية عادة صغيرة، ومن المكلف إعادة توليدها.يجب أن تكون طرق مسح الدفق العالي قادرة على التعامل مع أحجام صغيرة، وأن تكشف تراكيز منخفضة للمادة المحللة من أجل تخفيض الكلفة.أخيراً، يجب أن تكون لديهم قابلية للعديد من إعادة الاستعمال دون أن يكون هناك تناقص ملحوظ في الدقة أو الحساسية.

إذا أخذنا كل هذه المتطلبات في حساباتنا، فإن هدف مسح الدفق العالي يبقى ابتداع مفاعلات مخبرية مصغرة، والتي يمكن أن تعمل بالتوازي، وبنفس مستوى أنظمة الكشف فائقة الحساسية لمراقبة نتائج مسح الدفق العالي.إن ظهور نظام التقانة النانوية يظهر دور في هذا المجال بتسهيل ابتداع أنظمة مماثلة لما ورد سابقاً، ومن خلال تحسين الفهم وضبط المادة على المقياس النانوي واستثماراته اللاحقة١ ، ٢.

ب) هندسة المسح بالدقق العالي HTPS Architectures

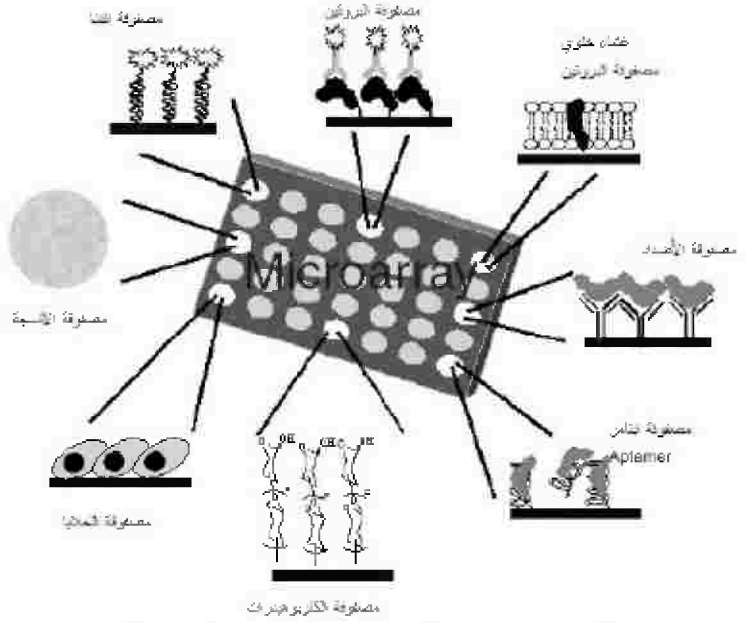
لقد مثلت تقنية المصفوفة الميكروية لحد الآن المسرح الأكثر انتشارا لمسح الدقق العالي في مجالي الطب الحيوي والتشخيص.وتأثيرها واضح في الزيادة الواضحة في حجم المراجع العلمية المتعلقة في المصفوفة الميكروية وتطبيقاتها (الشكل رقم ٤.١) وفي نمو سوق المصفوفة الميكروية من ٢٣٢ مليون دولار عام ١٩٩٩ إلى ٦.٢ بليون دولار عام ٢٠٠٤ [٣].

إن مواد الطور الثابت مثل صفائح المعايرة الميكروية والمراشح الغشائية والشرائح المجهرية المستخدمة في الفحوص الحيوية هي التي كانت مصدر الإلهام في تطوير المصفوفة الميكروية.هذه الوسائط تمثل بشكل فعال الركائز المسطحة، التي يمكن تعديلها بشكل ما؛ لتحمل مواقع سبر متعددة (عادة مئات أو ألوف).يحمل كل موقع سبر ربيطة أو لاجن أو مسبر يتعرف جزئ على جزيء متمم، يمكن أن يولد استجابة عند كشفها بتقنية تصويرية، على الأغلب بالفلورة، تشير إلى تفاعل كمي وكيفي.مواقع السبر هذه قد تكون على المستوى الميكروي أو النانوي.



الشكل رقم (٤.١).عدد المراجع العلمية المنشورة التي تتعلق بالمصفوفات الميكروية ومسح الدقق العالي من عام ١٩٨٠ إلى ٢٠٠٤.

يمكن أن تصنف هذه المصفوفات الميكروية على أساس المواد المصفوفة حسبها (الشكل رقم ٤,٢).وقد تم بناؤها باستخدام الدنا، والحموض النووية (الطبيعية والصنعية)، والبروتينات، والأضداد، والكاربوهيدرات، والأنسجة، والخلايا. أمثلة هائلة من هذه المصفوفات متوفر تجاريا، ووصف لأشكال وصفية سيظهر في هذا الفصل لاحقا.



الشكل رقم (٤,٢). أنواع المصفوفات الميكروية ذات السطح المسطح بواسطة المواد المصفوفة.

تبتعد الإستراتيجيات الجديدة لمسح الدفق العالي عن الأشكال الكلاسيكية.قد تقدم الاتجاهات الجديدة فوائد ملحوظة بما فيها انخفاض هائل في تكاليف التصنيع والتطبيق والتطوير للناتج. في هذا المجال، فإن المصفوفات المعلقة المعتمدة على السجلات المجموعة للحبيبات المعلمة تعد بتسهيل تحاليل فوق المسح الدفق العالي.

أخيراً، من الجدير بالذكر أن المصفوفات الميكروية لن تكون فعالة كما يجب بدون مساعدة السوائل الميكروية.السوائل الميكروية (microfuidics) هو مصطلح جديد يعرف أي عملية أو أداة تشارك في تدبير سائل ذي حجم ميكروي.في الواقع، المسح بالدفق العالي والسوائل الميكروية تتشارك كحساسات حيوية تجارية (رقاقات حيوية) غالبا ما تمثل شبكة معقدة من القنوات والحجيرات والصمامات والمضخات الميكروية ٥.

ج) **التقنية النانوية والمسح بالدفق العالي Nanotechnology and HTPS**

تلعب التقنية النانوية دوراً في صناعة المصفوفة الميكروية والرقاقات الحيوية ؛ لأن الأخيرتين تستفيدان من استخدام عدد كبير من أدوات التصنيع النانوي. وتضم الأمثلة على مساهمات التقنية النانوية : ١) التوضع الفراغي (الطباعة الميكروية وبخاخ الحبر) ضروري لوضع مواد المصفوفات الشبكية في النقاط على المستوى النانومتري أو الميكرومتري.٢) التنميط (النقش الضوئي) والبناء الميكروي (الآلية الميكروية، قوالب الحقن، التسجيل بالحض) لصناعة القنوات، والخزانات لنقل السوائل داخل الرقاقة و ٣) تقنيات التعديل السطحي الجزيئي (تعديل السطح بالطبقة الواحد المركب ذاتياً، التغليف السطحي باللف مع البوليمرات والغروانيات) لضبط خواص المصفوفة على المستوى الجزيئي (إلتصاق، الكره للماء، شحنة السطح، احتكاك).يجب أن تعدل أيضاً أنظمة الكشف للأخذ بعين الاعتبار الأبعاد النانومترية، والتراكيز المنخفضة للمواد المحللة المشمولة بالعملية.

مثلاً، إستراتيجيات الوسم المعتمدة على جسيمات نانوية المعدنية والنقاط الكوانتية تتغلب على قصور الملونات المفلورة التقليدية، وتسمح لحساسية عالية وتوازي في الكشف٦.أنظمة الكشف الحديثة المعتمدة على الرافعة، والأسلاك النانوية والألياف الضوئية من المتوقع أيضاً أن تزيد من الدقة والحساسية العملية الكشف٧.أخيراً، جمع

وتداول وتفسير البيانات المأخوذة من المسح بالدفق العالي بما فيها المقارنات، وتخزين البيانات المرجعية سيكون ضرورياً جداً للاستفادة المثلى من المسح بالدفق العالي لذا فإن المعلوماتية الحيوية ستكون مكوناً أساسياً في تطوير المسح بالدفق العالي مستقبلاً[٨- ١٠]

د) التطبيقات الأساسية للمسح بالدفق العالي في الطب الحيوي

Principal Applications of HTPS in Biomedicine

إن المسح بالدفق العالي تغير حالياً طرق تفكير الأطباء والعلماء بالأمراض ومعالجتها.خلال العقدين القادمين يمكن للمسح بالدفق العالي أن يحل محل الاتجاهات الفعالة المهيمنة على تشخيص ومراقبة الأمراض بتقنيات يمكن أن تتنبأ وتمنع أيضاً الخلل الوظيفي الخلوي والأمراض[١١].

التحليل العالمي للجينوم ومنتجات النسخ (mRNA)، وطلائع البروتين باستخدام مصفوفات البروتين والدنا سيساعد على تأسيس العلاقة بين الخلل في البروتينات الشائعة أو الشبكة التنظيمية للجينات، وحالات المرض وتطورها[١٢].إن سلسلة الجينوم الرخيصة والسريعة والصورة المتعددة الأشكال ستجعل من الممكن أن نصدر أحكاماً معقولة حول حالة المرض للأشخاص أو استعدادهم للمرض.كذلك يمكن للمقارنات على مستوى الأفراد لتعبير الجين أن يدعم هذه النشاطات، وأن يجعل تصنيف المتغيرات الجزيئة للأمراض ممكناً لأول مرة وبدقة[١٣].

يمكن أن تضيع الجهود المبذولة نحو إنشاء وسائل تنبؤية إذا لم تكن مترافقة بتطوير طرق ملائمة لمنع ومحاربة الأمراض.لذا فإن أنماط التعبير المستحصلة من بصمات mRNA ستستخدم للتعرف على الجينات، والتي هي أهداف علاجية محتملة.ستسرع مصفوفات البروتين الميكروية اكتشاف الأدوية البروتينية والببتيدية والتعرف على أهداف دوائية مرشحة للاستخدام في علم العقاقير[١٤].سيفتح استخدام المصفوفات في علم الجينات الدوائي الباب للطب الشخصي، والذي سيأخذ بعين الاعتبار نقاط علام

جينية نحو الميل للتأثيرات الجانبية للدواء و/أو فعاليته[١٥].ستستخدم المصفوفات المعتمدة على الخلية لاختبار فعالية وسمية أدوية قيد الدراسة[١٦].إن طاقة المعايرات المعتمدة على الخلية مجتمعة مع المصفوفات التحليلية الأخرى ستمكن من تبسيط، بشكل رئيسي تكثيف، لعمليات اكتشاف الأدوية التسلسلية، ومن ثم تخفيض الزمن والكلفة بوضع الدواء الواعد قيد التجربة السريرية.مثل هذه الدراسات عبر الزمن عندما تجتمع مع تطور معلوماتنا، وفهمنا للبروتينات والحموض النووية سيؤمن بيانات واسعة ومتشعبة عن البنى وفهم أعمق وجديد لعلم الخلية والذي نحتاجه لطب الشخصي التشخيصي والوقائي في المستقبل.

ثانياً:المصفوفات الميكروية ذات السطح المنبسط Flat Surface Microarrays

أ) المصفوفات الميكروية للدنا DNA Microarrays

تمثل الشرائح الزجاجية بالرقاقات السليكونية وأغشية النايلون بشكل أساسي الهندسة المستخدمة في المصفوفات الميكروية ذات السطح المنبسط والتي فيها عشرات الآلاف من تسلسلات الدنا يمكن أن تثبت في ترتيبات منتظمة.كل بقعة مصفوفة يشار إليها بأنها خاصة، ويمكن استخدام الخواص لكشف الدنا المتمم أو تسلسلات mRNA عبر تفاعلات تهجين[١٧].إذا كانت عينة الهدف موسومة بالفلورة فإن أتمتة مصفوفة يمكن أن يسمح لسلسلة الهدف؛ ليتم كشفه، وتحديد كميته بنفس الوقت من خلال تهجينه مع الخاصة.

يمكن أن تصنف مصفوفات الدنا على أساس المواد المصفوفة (دنا المتممة (cDNAs) أو قليل النوكليتيد (ONDs)) أو على أساس طرق التصنيع المستخدمة (مصفوفات البقعة أو المصفوفات المكروية المصنعة في الموقع) [١٨- ٣٢].تكون مواد

المصفوفة في مصفوفات الدنا المتممة عادة ناتجة عن تفاعل سلسلة البوليمرات (PCR) منتجة من دنا متممة مرجعية، أو مجموعات من النسائل موضعة على شرائح زجاجية أو أغشية نايلون.يمكن تصنيع مصفوفات ميكروية ذات قليل نيوكليدات قصير (25-15 mer) باصطناع قليل النيوكليدات في المكان على رقاقات سليكونية، أو بتنقيط قليلات النيوكليتيدات مسبقة الصنع (120-50 mer) على شرائح زجاجية.

عملية تصنيع المصفوفات الميكروية البقعية تتضمن ثلاث خطوات أساسية: (١) تعديل كيميائي للمادة المصفوفة بطريقة تجعلها قابلة للتفاعل مع المجموعات الوظيفية المتممة الموجودة على السطح؛ لتشكل رابطة ثابتة (عادة تساندية)، (٢) طلي السطح الداعم بمجموعات وظيفية كافية؛ لتسمح بروابط تساندية معينة، وتمنع الأدمصاص غير المعين للمواد المصفوفة، (٣) استخدام نظام إيتاء الذي يحمل كميات قليلة (عادة ٥٠- ١٠٠ نانومتر) من المادة المصفوفة إلى مواقع محددة على السطح (طباعة أو بخ الحبر).

يمكن الآن أن ينجز تعديل اصطناع قليل نيوكليدات للتثبيت خلال الاصطناع المؤتمت التقليدي.الأجزاء المستخدمة في الوصل يمكن أن تضاف عند النهايات'3، في المواقع الداخلية، أو عند النهايات '5 لمثل هذه الجزيئات حسب المرحلة التي تدخل فيها هذه الجزيئات بعملية الاصطناع. الأورغانوسيلينات (organosilanes) الحاملة لمجموعات رئيسة ملائمة قادرة على التفاعل مباشرة مع قليلات النيوكليدات المعدلة، وذلك لتفعيل السطوح الداعمة.المجموعات الوظيفية المستخدمة عادة هي الأمينات (amine) أو الأيبوكسيات (epoxy) أو الكاربوكسيلات (carboxyl) أو الهيدروكسيلات (hydroxyl).عوضاً عن ذلك يمكن استخدام عامل تصالبي (cross-linking) مثل غلوتارالدهيد (glutaraldehyde).

في حالة مصفوفات الدنا المتممة (cDNA) . فإن الشرائح المطلية بعديد الليسين (poly-lysine) غالبا ما تستعمل كركائز لتطعيم الدنا المتممة (cDNA). إن الدنا المنقط سيلتصق بمثل هذه السطوح بفعل تفاعلات كهرباء ساكنة.ولا يبدو أن التهجين مع نواتج تحلل الدنا يخرب هذا الالتصاق.

أو أن الإلتصاق للسطح بفعل روابط تساندية، والتي يمكن أن تحصل من خلال ترابط متصالب كيميائي- ضوئي أو باستخدام مرتسات معدلة مع مجموعات أمين خلال تفاعل ال(PCR) قبل التنقيط على سطح معدل بالألدهيد أو الكاربوكسيل.

يشمل تنقيط محلول من الدنا المتممة (cDNA)، أو محلول من قليل النوكليوتيدات (OND) أن تلامس إبرة أو دبوس السطح (تقنية الطباعة)، أو قذف قطرات سائل من فوهة نافثة بضغط عالٍ (تقنية قذف الحبر).أساسا هذا الدبوس هو ريشة قلم حبر غاية في الصغر بفجوة تسحب سائل التنقيط بفعل الخاصة الشعرية. يمكن تحميل الدبابيس حتى ١ ميكروليتر من السائل، ومن ثم إيتاء بقع من ٥٠ حتى ١٠٠ نانوليتر عند تلامسها مع السطح. عادة ما تتكامل عدة دبابيس أو نافثات، لتشكل رأس طباعة الذي يستعمل لتسريع عملية إنتاج المصفوفات. باستخدام هذه التقنيات يمكن تزويد سطح شريحة مجهر تقليدية بمصفوفة تتألف من أكثر من ٣٠,٠٠٠ بقعة بأحجام نمطية ذات قطر بين ٧٥ و ٥٠٠ ميكرومتر.

وهناك أمر يتعلق بالجودة وهو عدم تجانس التوزيع خلال عملية التنقيط لمحاليل الدنا المتممة (cDNA)، أو قليل النوكليوتيدات في كل نقطة والذي يظهر كنتيجة لتبخر المحل، أو كما يسمى مظهر الكعكة المحلاة. الوسائل المستخدمة لتجنب هذه المشكلة تشمل ضبط الشروط البيئية خلال عملية الترسيب (الرطوبة النسبية) وتعديل خصائص الترطيب للقطرة باستخدام مزيج محلات مختلف للمحلول.

هناك أمر آخر، وهو انتشار البقعة بعد وضعها على السطح.يمكن تجنب ذلك بتعديل السطح بطليه بعوامل كارهة للماء، والتي تؤدي إلى ارتفاع في التوتر السطحي، وضبط زاوية التلامس للقطرة.

تصنيع مصفوفات قليل النيوكليدات المصنع في الموقع يشمل اصطناع كيميائي متوازي مرتبط بالضوء والفراغ[٣٣].السطح مطلي بجزيئات رابطة تحمل مجموعات حماية من الضوء، أو مغطى بطبقة مقاومة للضوء.نمط التشعيع (الموجه بأداة الحجب) يرفع الحماية (يزيل المقاومة الضوئية) من مناطق معينة التي يتم تزاوجها مع وحدات غير متبلمرة، والتي تكون معرضة.ويتم إعادة العملية لإنشاء تسلسلات مختلفة في مواقع مختلفة. مثل هذا الاصطناع التجميعي يؤهل وجود تسلسلات مختلفة على البادئة 4' بطول n التي تحضر في عدد من الخطوات الكيميائية يساوي 4xn.يسمح استخدام هذه الطريقة باصطناع مصفوفات مساحتها ١.٦ سم٢ تحمل عدداً من الخواص يصل إلى ٤٠٠ ألف.من حيث المبدأ فإن الحجم الأدنى للخاصة في هذه المصفوفات يعرف من حيث طول الموجة لمصدر التشعيع، ولكن عملياً التقنيات الحالية أنتجت فقط خصائص أدنى حجم لها هو ٢٥ ميكرومتر.

تختلف أيضا مصفوفات قليل النيوكلوتيدات عالية الكثافة المصنعة في الموقع عن المصفوفات النقطية بأن الهدف يحتاج لأن يصنع حسب التحديد الكمي.في كلتا الحالتين يتم استخلاص المادة الوراثية من الخلايا أو الأنسجة، وتضخم، وتوسم بالفلورة.ثم تضاف عينة الحمض النووي المعلم للمصفوفة، ويتم تهجينه مع قليل النيوكلوتيدات المتمم.ويمكن استخدام نظام كشف الفلورة المناسب. أن نولد بسرعة صورة مفلورة ثنائية الأبعاد كمية لكثافة التهجين.

تسمح رقاقات قليل النيوكلوتيدات المصنع في الموقع بتحديد مباشر لعدد تسلسلات الهجينة من كثافة الفلورة عند كل خاصة بدرجة عالية من الدقة والتكرارية.وبالعكس فإن عملية التشبيك في المصفوفات النقطية غير دقيقة لتسمح بالمقارنة بين مصفوفات مختلفة، ويصبح من الضروري مزج وتهجين الحمض النووي المرجعي لنفس المصفوفة، مما ينتج عنه ارتباط تنافسي للهدف مع التسلسلات المصفوفة.يتم وسم الحموض النووية المرجعية والهدف بأصبغة فلورة مختلفة ويمكن كشفها بمسح المصفوفة عند قيمتين مختلفتين من λ max cm لأطوال الموجة. ينتج عن مقارنة شدة الفلورة للحمض النووي المرجعي، والهدف عند نفس الخاصة قياس كمّي لكل تسلسل على المصفوفة[٣٤].

بشكل عام، يحد أداء (من حيث السعة والحساسية) مصفوفات الدنا عاملا تصنيع أساسيان: ١) عدد مواقع المسبار (الخواص) بوحدة المساحة، والذي يعكس كثافة المعلومات و ٢) عدد جزيئات المسبار بوحدة المساحة داخل موقع المسبار الفردي والذي يحد من عدد جزيئات الهدف التي يمكن أن ترتبط بالمصفوفة، وبالتالي مستوى الحساسية العظمى للمصفوفة[٣٣].من أجل الحصول على سعة قصوى للمصفوفة يجب أن تكون الخواص وتباعدها أصغر مايمكن مع الاحتفاظ بالحساسية الكاملة والتمييز في الكشف.إنقاص حجم الخواص له ميزة إضافية في الحاجة إلى عينة بيولوجية أصغر لكل تحليل.

ولقد تم إدخال عدة مناحي لزيادة كثافة OND أو cDNA في الخاصة. أحد هذه المناحي هو ربط السطح بجزيئات متشعبة تعمل كروابط متعددة الوظيفة وتزيد من كثافة المجموعات الوظيفية على السطح.طريقة أخرى هي زيادة مساحة السطح المتوفرة بتشكيل بنى مسامية ثلاثية الأبعاد على السطح المنبسط.من الطرق المستخدمة في هذا

المجال الطلي الدوراني بالهلام للسطوح المنبسطة، وتوضيع أفلام رقيقة مسامية من جزيئات السليكا الغرويدية النانومترية.تسمح زيادة مساحة السطح المتوفرة في البنية المسامية بتثبيت عدد أكبر من الجزيئات الآسرة لكل بقعة، وتؤدي إلى تعزيز إشارات التهجين (أعلى بعشرين مرة في حالة الأفلام الغرويدية)[٣٥].

هناك عدة أمور تؤخذ بالحسبان عند اختيار النوع الأكثر ملائمة من مصفوفة الدنا حسب التطبيق المرغوب.للمصفوفات النقطية ميزة تتفوق بها على المصفوفات المصنعة في الموقع بأنها من السهل تأهيلها حسب الحاجة الشخصية حيث إنها من الممكن إنتاجها مباشرة في المختبر من الباحثين. ولكن من الناحية العملية تخشى معظم المخابر من مهمة تدبير مكتبة النسائل، ومن ثم فإن صناعة مصفوفات نقطية عالية الجودة يكون صعباً.تقدم مصفوفات OND الميكروية مزايا تفوق مصفوفات cDNA الميكروية: ١) إنها أكثر نوعية؛ لأن التسلسلات المثبتة يتم اختيارها لتقدم فقط جزء معين من تسلسل الهدف المفيد للأسر التهجيني و ٢) واحتمال وجود متغيرات متداخلة مميزة[١٣]. ولكن عمليات التصنيع المعقدة في مصفوفات OND في الموقع، وكلفة إنتاج عدد ضخم من ONDs طويلة المطلوبة للمصفوفات النقطية يجعل ثمن هذه المصفوفات مرتفعاً ويحد من قابلية تطبيقها من قبل مجموعات البحث الأكاديمية. من الأمثلة المهمة لأحد تطبيقات مصفوفات DNA هو تحليل تفاعل DNA – بروتين، والتي تشمل الكروماتين.هذه التفاعلات عابرة، لذا من الصعب توصيفها في حالتها الفزيولوجية[٣٦].إن الجمع بين معايرة الكروماتين بالترسيب المناعي (ChIP) مع تقنية مصفوفة DNA يسمح بمثل هذا النمط من التحليل.في تجربة رقاقة ChIP يتم تثبيت معقدات DNA- بروتين في الخلايا الحية بالربط التصالبي مع الفورمالداهيت.إن تعريض الخلايا لأمواج فوق صوتية يمزق DNA إلى شدف، ويعزل معقدات DNA- بروتين الهدف بترسيبها مناعياً مع ضد نوعي

للبروتين.ثم يتم عكس الربط التصالبي مع الفورم الداهيد، ويتم تنقية DNA، ويضخم بال PCR، ويوسم بمعلم متفلور، ويهجن مع مصفوفة DNA ميكروية؛ للتعرف على مناطق ال DNA المرتبطة بالبروتين.

أحد التحديات الرئيسة التي تواجهها مصفوفات DNA الميكروية هو إيجاد الحل الفعال للأسئلة السريرية٣٧- ٤٠.في معظم الحالات يتطلب ذلك إما تصنيع مصفوفات حسب الطلب؛ لتوصيف أمراض محددة، أو تصنيع مصفوفة تحلل الجينوم كاملاً وجمعها مع طرق تحليلية نوعية، والتي تسمح بتحليل الجينات المرتبطة بكل مرض.إن الحاجة إلى مصفوفات بسيطة تقنياً ورخيصة الثمن وبرامج حاسوبة تحليلية سهلة الاستخدام لتجميع وتفسير المعطيات يتطلب تطوير تقنيات الأتمتة والنمذجة للخواص المصفوفية ولمعالجة المصفوفات، وكذلك تقنيات سطوح جديدة وكيمياء لتنميط وتفعيل الشرائح الزجاجية والركائز الأخرى، وكذلك بروتوكولات وسم وأصبغة جديدة[١٣].

ويقع مجال أخر للتطوير في المشكلة المتعلقة بحجم العينة المطلوبة للتحليل.تحتاج تجارب المصفوفات الميكروية نموذجياً إلى ١٠ إلى ٤٠ ميكروغرام من حمض نووي عالي الجودة؛ لتعمل.هذا يعكس تقريباً قطعة نسيج بحجم ١٠٠ ميلي متر مكعب. هذه المتطلبات تمثل كمية كبيرة من المادة وبشكل مثالي يجب أن تخفض أخيراً درجة الحساسية والنوعية والدقة والتكرارية في تقنية المصفوفة الميكروية المطلوبة؛ لتشخيص دقيق في المجال الطبي تكون أحياناً تفوق مايمكن الحصول عليه في الـ PCR.سيكون من الضروري والأساسي في الأبحاث المستقبلية لتطوير الـ HTPS في هذا المجال: تحسين الفعالية التصنيعية، وتخفيض المتغيرات التجريبية، وزيادة الحساسية.

ب) مصفوفات البروتين Protein Arrays

إن العمل في تصنيع مصفوفات البروتين أقل تطورا منه في تصنيع مصفوفات الـ DNA.٤١ السبب الأساسي في ذلك أن الـ DNA (وكل الحموض النووية بشكل عام) يمكن تمثيلها على أساس أنها جزيئات لها خصائص كيميائية محددة معروفة وقليلة ولكن البروتينات معقدة أكثر بكثير في البنية، وتمثل خواص كيميائية واسعة المجال وكذلك الطرق التي يمكن أن تتفاعل بها البروتينات مع أهدافها أو الجزيئات المتممة عديدة وتختلف وغالباً ما تعتمد على بنى البروتين الرباعية والثالثية وليس ببساطة على تركيبها الكيميائي. يمكن لروابط التفاعلات أن تشمل قوى ترابط ضعيفة. و تفاعلات كهرباء ساكنة. روابط هيدروجينية... إلخ.في حالة الحموض النووية فإن الاعتبار الرئيس هو الروابط الهيدروجينية والأسس المتممة والتي تمثل حالات أكثر بساطة وأسهل للضبط.

لذا لايمكن أن نتوقع أن تتصرف البروتينات بصورة متوقعة مثل الحموض النووية عندما تكون مثبتة على سطوح صلبة. في الواقع هناك بعض الصفات المفيدة والأصيلة للبروتينات يمكن أن تعطل أو تغيب عندما تكون البروتينات بأشكالها المثبتة.على جميع الأحوال، يمكن لكيمياء التثبيت المستخدمة أن تؤدي إلى تعطيل الخواص المرغوبة بحد ذاتها في تطبيقات المصفوفة. التمسخ الكيميائي وتغيرات الشكل الفيزيائي وتثبيت جزء من الجزيء (حاتمة في المستضد) المطلوبة لتطبيق المصفوفة يمكن أن تقود كلها إلى تعطيل وظيفة المصفوفة.

هناك مشكلة محتملة أخرى متعلقة ببناء وتطبيق مصفوفات البروتين وهي وجود مماكبات (isoforms) للبروتينات: يمكن أن يظهر البروتين نفسه في متغيرات معدلة بعد الترجمة ومختلفة، وكذلك أشكال مختلفة من نفس البروتين يمكن أن تظهر كنتيجة

لتضافر الجين (المورثة).لذلك من الصعب جداً تعريف مصفوفة بروتين ميكروية وإنتاجها بشكل يعمل بتكرارية وفعالية. أخيراً هناك عامل صعوبة آخر، وهو أنه ليس هناك وجود لما يشابه ال PCR في مجال البروتينات.لذا لانستطيع تضخيم كمية البروتين للتثبيت، أو الكشف بأية طريقة ملائمة. لذا، فإن إمكانيات وتطبيقات مصفوفات البروتين الميكروية بعد التغلب على هذه التحديات عظيمة جداً. في الواقع يمكن لمصفوفات البروتين الميكروية أن تخاطب تطبيقات حالياً مستحيلة بطريقة أسس الحموض النووية. مثال محدد هو في المسح الوبائي للمناعة لأمراض معدية. عدد مختلف من مصفوفات البروتين الميكروية تم تطويرها، ويمكن أن تصنف على أساس المواد المصفوفة وتطبيقاتها الوصفية٤٢ كما يلي:

مصفوفات التفاعلية — مصفوفات منخفضة الكثافة لبروتينات ذات منشأ طبيعي منقاة مستخدمة في التحليل الكمّي للتفاعلات مع بروتينات أخرى أو حموض نووية أو جزيئات صغيرة.

مصفوفات وظيفية — مصفوفات مؤلفة من بروتينات ذات منشأ طبيعي منقاة مستخدمة في التنبؤ بوظيفة البروتين.

مصفوفات أسر الألفة (تعبير البروتين) — مصفوفات فيها كواشف ألفة قادرة على التعرف على بروتينات نوعية وتحديد وجودها وكميتها في مزيج (انظر الفقرة التالية).

عند اصطناع مصفوفات البروتين عادة يتم تنقيط المواد التي ستثبت آلياً على السطوح المطلوبة بالتوزيع الميكروي وبالتعامل الآلي مع السوائل بتقنية مماثلة لتلك المستخدمة في مصفوفات الدنا[٤٢،٤٣].أو البديل في حالة مصفوفات الخواص تحت الميكرومتر للبروتينات يمكن أن تشكل باستخدام " قلم غاطس" للنقش

النانوي[٤٤،٤٥].تسمح هذه الطريقة بضبط قياس الخاصة؛ ليكون أقل من ١٠٠ نانومتر.لاتزال هذه الطريقة بحاجة إلى تحسين.

إن تأمين الكميات الكافية من البروتينات مايزال العائق الأساسي في بناء واستخدام مصفوفات البروتين[٤٦].الطرق الشائعة لتأمين كواشف البروتين لهذا الغرض تتضمن الاستنساخ والتعبير والتنقية الموازية بواسطة التفريق اللوني للجزيئات المطلوبة.تتضمن طريقة بديلة آلية مركبة باصطناع خواص على رقاقة بطريقة مشابه لتلك المستخدمة في مصفوفات الدنا المصنعة في الموقع لتوليد مصفوفات ببتيدية عالية الكثافة[٤٧،٤٨].معظم البروتينات هي مركبات سريعة التبدل وعرضة لفقدان الفعالية و/أو التغيرات الشكلية خلال التعديل والتثبيت. وبالتالي جهود كبيرة تم استثمارها في أمثلة خواص السطوح الداعمة في تقنية مصفوفة البروتين من أجل ضبط نقاط الاتصال وكثافات هذا الصف من للاجن بتخفيض الأدمصاص غير النوعي للبروتينات على السطح وتمسخ البروتينات المثبتة[٤٩].

ممكن للبروتين أن يثبت على السطوح في طرق موجهة وغير موجهة.تتضمن التقنية غير الموجهة عادة تثبيت عشوائي للبروتينات على السطح المفعل بمجموعات وظيفية قادرة على التفاعل مع مجموعات وظيفية غير نوعية على البروتين.أي هذا قد يشمل تفاعلات كارهة للماء بين المبلمرات النتروسلولوزية والبروتينات، أو الروابط التساندية للأمينات، أو الألدهيدات ،أو مجموعات الإبوكسي على الركيزة والأمينات الحرة، أو المجموعات الكاربوكسيلية التي يملكها البروتين. يؤدي مثل هذا التثبيت إلى ارتباط شدف من البروتين بطريقة موجهة، والتي تثبط تفاعلها مع الهدف المطلوب.

يمكن أن يؤمن التثبيت الموجه ضبط أحسن بكثير من وصول جزيئات الهدف إلى المواقع الفعالة للبروتين المثبت.هذا تم توضيحه في حالات ١) الهيستيدين البروتين المعلم

بال His على سطوح معدلة من حمض النتري لوتري اسيدك بوجود شاردة النيكل Ni+2، ٢) البروتين المعالج بالبايوتينيل على طبقة وحيدة من الستربتافيدين و ٣) أضداد عن طريق أكسدة جزيئات كربوهيدرات على منطقة ال Fc وارتباطها عن طريق روابط تساندية مع مجموعات الهيدرازيد السطحية.

صف آخر مهم من مصفوفات البروتين، هو المركبة من بروتينات الغشاء الخلوي مثل مستقبلات متزاوجة مع بروتين G (GPCRs)؛ يحتاج التثبيت إلى عناية خاصة للحفاظ على وظيفة البروتين. GPCRs في حالتها الطبيعية (وظيفياً) منغرسة في الطبقة الثنائية الفوسفوليبيدية التي تشكل الغشاء الخلوي، وهذه البيئة (مع التوجه الصحيح للبروتين ضمن الغشاء) ضرورية جداً للـ GPCRs للحفاظ على الأشكال المطوية وعلى الأدوار الفيزيولوجية كمستقبلات على سطح الخلية مسؤولة عن تحويل إشارات الأكسجة إلى استجابات داخل الخلية.لذلك فإن تصنيع مصفوفة GPCR يحتاج إلى تثبيت مسبار الـ GPCR وغشائه الليبيدي بنفس الوقت على سطح المصفوفة.وأكثر من ذلك فإنه يجب على الغشاء الليبيدي أن ينزاح عن السطح؛ لتجنب التلامس الفيزيائي والذي يمكن أن يسبب انفكاك الطبقات، أو التعطل الوظيفي للقطاع خارج الغشاء للمستقبلات. التثبيت التساندي لكامل الغشاء غير مرغوب فيه أيضاً، لأن الحركة الجانبية جوهرية، وهي فيزيولوجياً خاصة هامة للأغشية الطبيعية.

تم تصنيع مصفوفات غشاء البروتين الميكروي بطريقتين مختلفتين.تستخدم الطريقة الأولى، التثبيت المباشر للأغشية على ركائز منمطة ميكروياً مؤلفة من مناطق ارتباط لاغشائي، ومناطق ارتباط غشائي.تستخدم الطريقة الثانية تقنية التنقيط الميكروي بطباعة مباشرة لمحاليل الأغشية، أو بروتينات الغشاء على سطوح الربط الغشائي٥٠.تستخدم السطوح المعدلة بالأمين لهذه الأغراض حيث تبدو أنها تؤمن

المجموعة الأفضل للمتطلبات المشار إليها في الأعلى: الحفاظ على التوجه والشكل البروتيني والسيولة الجانبية والثباتية الميكانيكية للغشاء المثبت.

كشف وتحديد كمية تفاعل البروتينات المثبتة والمصفوفة مع لاجيناتها هو أمر هام [٤٩].تعتمد الطريقة المفضلة في كشف حوادث الارتباط على مصفوفة البروتين الميكروية على الفلورة.يمكن إدخال المتفلورات في المعايرة عن طريق ١) الوسم بالفلورة المباشر للعينة المدروسة أو ٢) المقايسة المناعية المترية المتضمنة أضداد موسومة.يمكن أن يبدو الوسم المباشر هو الطريقة الأسهل والأقل كلفة، ولكن الأمر الهام هو تغير البروتينات بوجود المتفلورات وبالتالي تعديل وظائفها و/أو بنيتها.وكذلك لمعايرات الارتباط المتعددة هناك حاجة إلى مزائج من الواسمات المتفلورة مما يجعل المعايرة بشكل عام والكشف بشكل خاص أكثر تعقيداً.

هناك تقنيتان تحليليتان لاتحتاجان لوسم البروتينات لكشفها واللتان تعدان بفائدة كبيرة لتحليل HTPS للمعقد ولخلائط بروتين غير معرف، وهما مطيافية الكتلة ذات الليزر المساعد بالمصفوفة (MALDI-TOF-MS) ومرنان سطح البلازما (SPR).يستخدم MALDI-TOF-MS نبض ليزر لفك ادمصاص البروتينات المثبتة من على سطح المصفوفة، يتبع ذلك التعرف على أوزانها الجزيئية بمطيافية الكتلة.أما ال SPR فيعتمد على التغير بقرينة الانكسار الوسطية للسطح، والذي يحصل عند تثبيت البروتين على السطح.تعرض هذه التقنية ميزة العمل في السائل- لاتتطلب أن يتم شطف الركيزة وتجفيفها قبل التحليل، ومن ثم يمكن أن تقدم معلومات حركية عن تفاعلات الارتباط.هذا هام خاصة عند التحديد الكمي للتفاعلات بروتين- بروتين قليلة الألفة والتي من الصعب تحليلها باستخدام بروتوكولات فيها غسيل تجفيف.لكن هذه

التقنيات عليها أن تثبت فوائدها في تحليل البروتين على مقياس كبير[١١].يوضح الجدول (٤.١) مقارنة بين إستراتيجيات الكشف المختلفة.

الجدول رقم (٤،١).مقارنة بين طرق الكشف من أجل تحليل مصفوفات البروتين.

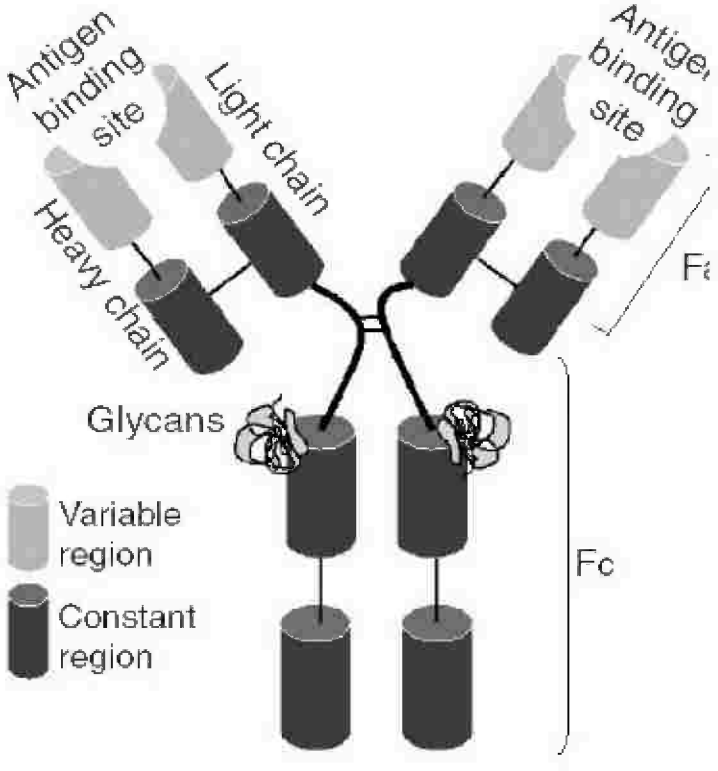
طريقة الكشف	تحليل كمي	تحليل في الوقت الحقيقي	نماذج غير موسومة	معايرة غير متحيزة	متاح
الفلورة	نعم	لا	لا	لا	عالي
الوسم الإشعاعي	نعم	لا	لا	لا	عالي
MALDI-TOF	نصف	لا	نعم	نعم	وسط
SPR	نعم	نعم	نعم	جزئي	محدود

ج) مصفوفات أسر الألفة Affinity Capture Arrays

تتألف مصفوفات الأسر الإلكتروني من مجموعات من كواشف أسر الألفة المثبتة. هذه الكواشف هي جزيئات يمكن أن تتفاعل خاصة مع مستضدات معينة أو أنواع جزيئية أخرى بسبب عملية تعرف.غالباً ما تستخدم الأضداد ككواشف أسر الكتروني، بالرغم من أن أنواع جزيئية أخرى مثل شدف الأضداد، أو بروتينات كروية صغيرة، أو جزيئات عضوية صغيرة أو أبتيمر (aptamer) (قليل النوكليوتيد وحيد الشريط ذو الألفة لجزيئات البروتين المفردة) يمكن أن تستخدم لهذا الغرض.يمكن أن تمثل الأنواع المتفاعلة و المستضدات صفوف جزيئية مختلفة، تتراوح ما بين بيولوجي (بروتينات، و هرمونات)، وجزيئات غير بيولوجية (أدوية معينة).

يتم إنتاج الأضداد(Antibodies)(Abs) أو الغلوبولينات المناعية (immunoglubolins) (Igs) من الجهاز المناعي الخاص بالمتعضية كجزء من الاستجابة المناعية الخلطية لتحريض مستضد رئيسي.وتتألف من أربع تحت وحدات بروتينية: سلسلتين ثقيلتين متماثلتين من عديد الببتيد(٥٣ إلى ٧٥ كيلو دالتون kD) و سلسلتين

خفيفتين متماثلتين (تقريبا ٢٣ كيلودالتون kD).هذه التحت وحدات ترتبط من خلال روابط ديسولفيد و تفاعلات غير تساندية أيضا؛ لتأخذ شكل حرف الـ Y تناظري مثنوي (الشكل رقم ٤.٣). تحتوي أذرع هذا الجزيء على شكل (Y) المناطق المتغيرة المسؤولة عن التعرف على المستضد، لذا فإنها تشكل شدف الارتباط الفعالة (Fab). ويحتوي جذع الـ Y (الشدفة المبلورة، Fc) على المواقع التي تتعرف عليها آليات دفاع المضيف.



الشكل رقم (٤.٣).بنى الأضداد.

إن الهندسة الجزيئية الخاصة وعمليات تعرف المستضدات بالأضداد تتطلب أن يكونوا موجهين بشكل معين من حيث اتصالهم بالسطح: لتأمين أدائهم الأمثل بالمعايرة.وكذلك فإن بنيتهم تكرس نفسها لهذا الغرض.مثلا، السلاسل الثقيلة من الأضداد تحتوي على سكاريدات متصلة بآزوت متوضعة في مناطق الـ Fc من الجزيء.إن أكسدة مجموعات الهيدروكسيل في السكر إلى ألدهيدات وارتباطها تساندياً بأمين أو بسطح مصفوفة معدل بهيدراأزيد (hydrazide) سينتج عنه توجه للضد المثبت بحيث تكون منطقة الـ Fc غير الفعالة موجهة نحو سطح المصفوفة و منطقة الـ Fab للخارج نحو البروتين الهدف.يمكن الحصول على تأثير مماثل بتعديل سطح المصفوفة بجزيئات مثل اللاكتينات التي تمتلك ألفة نحو الكاربوهيدرات.[٥١،٥٢]

يمكن أيضا الحصول على التثبيت الموجه باستخدام بنى الشطيرة.مثلا، جزء الـ Fc من الضد يمكن التعرف عليه بشكل خاص من البروتينات A و G.إذا كان سطح المصفوفة معدل سابقا من قبل هذه البروتينات. والتثبيت اللاحق للـ Abs يكون بعد منطقة الـ Fc. وبالعكس، يتفاعل البروتين L مع القطاعات المختلفة من السلاسل الخفيفة من الأضداد، و الأضداد المثبتة في هذه الحالة ستعرض منطقة الـ Fc بشكل مفضل للهدف.[٥٢] هناك ثلاثة معايير رئيسة هامة في تحديد نجاح استخدام مصفوفة الألفة وتطبيقاتها:

١- الخواص الفيزيائية والفيزيوكيميائية الداخلة في تفاعلات الارتباط (حركية الارتباط/التفكك أو k_m) ثباتية المعقد المتشكل تحت شروط المصفوفة و نوعية عملية التعرف.

٢- التأثير الممكن للتثبيت على كواشف الألفة (إمكانية وصول هذه المناطق من اللاجن المثبت للمستضد، و كثافة السطح للاجن الألفة، و التأثيرات المثبطة أو السلبية لكيمياء التثبيت على اللاجن)

٣- التركيز الكلي لمستضد معين، أو أي رابط آخر في مزيج وتركيزه بالنسبة للروابط الأخرى الموجودة (التأثيرات التنافسية لجزيئات رابطة ذات علاقة قريبة أو بعيدة للاجن الألفة ؛ تأثيرات مثبطة عند تراكيز منخفضة جداً لرابط معين بينما توجد مع تراكيز عالية من جزيئات أخرى ؛ تفاعلات ركائزية بين جزيئات نوعية، ولا نوعية بالتشظي sequestration)

يحتاج تصنيع مصفوفات الأضداد إلى إنتاج كميات كبيرة و أعداد من الأضداد- والتي يمكن إنجازها بتقنية التهجين أو عن طريق بنوك العائية (فيروسات تهاجم الجراثيم، لتستولي على طاقاتها وتوجهها لصنع الهجين الخاص بها) (phage).بالرغم من أن هذه الطرق قد طورت كثيرا إنتاج الأضداد، ولكن تبقى مرتفعة السعر، وهذا مما يحد من استخدام وتطبيقات مصفوفات الأضداد.

كبديل لاستخدام الأضداد ككواشف ألفة، قد تم اقتراح مستقبلات صنعية مصنعة نانويا قادرة على التعرف نوعيا على أشكال البروتين.[٢] عن طريق الطبع الجزيئي لأفلام مشابهة لعديدات السكاريد بالأشكال ثلاثية الأبعاد لجزيئات البروتين تم الحصول على سطوح مهندسة قابلة للتطبيق في الفصل الكيميائي الحيوي والمعايرات.تم اختبار مثل هذه السطوح في ادمصاص البروتينات من محاليل مفردة أو مزيج، وتم ادمصاص البروتين بشكل مفضل على المواقع على السطح حيث تم طباعة الشكل المتمم.

د) مصفوفات الكاربوهيدرات Carbohydrate Arrays

هناك عدة أسباب لدراسة الغليكانات (glycans) في الطب الحيوي (يمكن تعريف الغليكانات على أنها كاربوهيدرات التي يمكن أن تتفكك بالحلمهة (hydrolysis) إلى جزيئين أو أكثر من أحادي السكري). تتألف المتعضيات الحية من خلايا مغطاة بأشكال

مختلفة من الغليكانات التي تساعدنا على التعرف على أنماط الخلية وحالاتها.تعمل هذه الغليكانات على حماية الخلايا ضد ضغوط فيزيائية خارجية (مثلاً التجمد) والهجمات الكيميائية الحيوية (مثلاً، البروتياز proteases)، وتساعد في التعرف خلية- خلية، والالتصاق وعمليات- الإشارة والتي هي ضرورية؛ لإصلاح أو ترميم ونمو النسيج العادي بالإضافة إلى تحول الخلية الورمية والانتقالات.

الارتباط بالغلوكوزيد (glycosylation) هو شكل من التعديل المصاحب للترجمة أو بعد الترجمة (post- or co-translational modification) والذي يحصل خلال اصطناع البروتين حقيقي النواة (eukaryotic)، وهي عامل أساسي في تحديد عمل أو تعطيل البروتين.أخيراً، تلعب غليكانات سطح الخلية دوراً هاماً في إصابة الخلية بخمج جرثومي وفيروسي للمتعضيات المضيفة.تستفيد المكروبات من هذه الجزيئات لتتعرف وتحصل على الدخول إلى الخلايا المضيف.

بالرغم من الأهمية البيولوجية للكاربوهيدرات، فإن تحديد خواص بنيتهم وإيضاح وظائفهم تأخر عن تحديد خواص البروتينات والحموض النووية.هذا ناجم بشكل كبير عن حقيقة أن عديدات السكريد في الطبيعة لها أشكال بنيوية واسعة الاختلاف مما يجعل دراستها صعبة. مثلاً يمكن أن تختلف عديدات السكريد من حيث بقاياها أحادية السكريد، وكذلك أيضاً بأنماط، والنسب الجزيئية للروابط التي تربط بينها.تجعل هذه الاختلافات تحديد صفات عديدات السكريد صعبة بالسلسلة أو تحديد الروابط أو تحليل البنية ثلاثية الأبعاد.الاصطناع الحيوي لسلسلة السكر معقد.بعكس ترجمة الرنا والرسول (mRNA) إلى بروتينات، والذي يحدث بتوسط عملية الترجمة بشكل دقيق فإن الاصطناع الحيوي للسكريات وعديد السكريدات يتطلب العديد من الإنزيمات وطرق اصطناع حيوي معقدة. أيضاً، فإن عمل عديد السكريدات في

الأجهزة الحية يعتمد بالتحديد على احتوائه على بنى ثالثية فريدة ونوعية وغالباً رباعية أيضاً.لذلك فإن عزلهم وتثبيتهم على سطوح لتصنيع المصفوفات المكروية يحتاج إلى عناية خاصة.

يمكن التمييز بين الأنواع المختلفة للمصفوفات الكاربوهيدرات الموجودة على أساس الطول الجزيئي (وما يلحقه من تعقيد) للغلايكان المثبت.تم وصف مصفوفات أحادية السكريدات وثنائية السكريدات وقليلة السكريدات والكاربوهيدرات المحتوية على جزيئات كبيرة (بما فيها مصفوفات عديدات السكريدات والمصفوفات المختلفة للمقترنات السكرية (glycoconjugate)) [٥٣].الأشكال البسيطة المؤلفة من أحادية السكريدات وثنائية السكريدات ملائمة للمسح الأولي وتوصيف البروتينات المرتبطة بالكاربوهيدرات الجديدة أو الأنزيمات المحفزة للكاربوهيدرات، ولتحديد المثبطات الجديدة لتفاعلات بروتين- كاربوهيدرات. ولكن هناك بروتينات معينة مثل اللكتينات والعديد من الأضداد التي لها تفاعلات ضد الكاربوهيدرات يمكن أن تتعرف فقط وترتبط بلواجن كاربوهيدراتية أكبر وأكثر تعقيداً أو بمحددات مستضدية.إن المصفوفات السكرية ثنائية السكريد وأحادية السكريد غير قادرة على حل مشاكل تقصي مثل هذه الأهداف الجزيئة. في الواقع مصفوفات قليل السكريد وعديد السكريد والمقترنات السكرية تستخدم لإنجاز هذه المهمة.

يمكن أن يتم تصنيع مصفوفات الغليكان إما بالاصطناع في الموقع أو بتنقيط الكاربوهيدرات على سطوح داعمة مفعلة.يمكن استخدام وسائل متعددة " حسب طبيعة السطح الداعم ونمط الغليكان" لربط الكاربوهيدرات بالسطح الداعم.أعطت شرائح الزجاجية المغطاة بالنتروسلولوز وأغشية السللوز خاصة نتائج جيدة كسطوح داعمة في تصنيع مصفوفة الغليكان.إن بوليمر النتروسلولوزي هو مشتق كامل النترجة

للسللوز حيث تم استبدال مجموعات الهيدروكسيل الحرة بمجموعات نترو، وبالتالي فإن البوليمر كاره للماء بطبيعته.مايزال من غير الواضح لما يتم ادمصاص عديد السكريدات الغنية بمجموعات الهيدروكسيل والمحبة للماء بطبيعتها على سطوح داعمة نتروسللوزية. طرح أن يكون التوضيع المسامي الميكروي ثلاثي الأبعاد للنتروسللوز والطبيعة البولمرية لعديد السكريدات تجتمع معاً؛ لينتج عنها شكل ثابت بشكل خاص لعديد السكريدات على السطح الداعم.يمكن لسطوح النتروسللوز أيضاً أن تستخدم لتثبيت البروتينات السكرية.ويعتقد أن التثبيت يحصل عن طريق تفاعل المناطق الكاره للماء في البروتين مع سطح الغشاء.

إن الربط التساندي للغليكانات بسطوح يتطلب تعديل كيميائي مسبق لجزيئات الكاربوهيدرات المستخدمة.للمتابعة في هذا المجال هناك عدة طرق بما فيها: ١) ارتباط غليكينات البوتينيل (biotinylated glycans) بسطوح الستربتافيدين (streptavidinated surfaces). أو ٢) ارتباط عديد السكاريدات الحاملة لمجموعة تيول نهائية (thiol-terminated polysaccharides) بطبقة أحادية مصنعة ذاتيا ذات مجموعة هيدروكسيل نهائية (hydroxyl-terminated self-assembled monolayers). أو ٣) ارتباط عديد السكاريدات المنتهية ببنتاديين حلقي (cyclopentadiene-terminated polysaccharides) بطبقة أحادية مصنعة ذاتيا منتهية بكوينون (uinine-terminated self-assembled monolayers) بتفاعل ديلز- ألدر (Diels-Alder reaction).[٥٣،٥٤] بطريقة مماثلة لطريقة مصفوفات البروتين، فإن توجه الغليكان المثبت ضروري لفعالية المصفوفة.مثلا يجب أن يعرض السكر من النهاية المرجعة للتعرف الناجح على البروتين.ولكن الوصول العملي إلى كاربوهيدرات كافية ببنية محددة (إما بالعزل أو الاصطناع) ما يزال مشكلة.[٥٥]

مايزال هناك موضوع مطروح للحل في المستقبل فيما يتعلق بالغليكوميك وتحليل التفاعلات بين بروتينات الرابطة للكاربوهيدرات وقليلات السكريدات، وهو كيف يمكن للطريقة أن تستخدم بدقة لتحديد الألفة الضعيفة في مثل هذه التفاعلات؟ معظم تفاعلات اللكتين- كاربوهيدرات ضعيفة نسبية، ولايمكن أن تقاس كمياً بالتقنيات الحالية.من منطلق بيولوجي هذا مهم؛ لأن حوادث التعرف خلية- خلية افتراضياً بواسطة اللكتينات على الأقل جزئياً ومن المتوقع أن تكون ضعيفة وليست قوية.من الممكن أن يكون لهذا أهمية خاصة في دراسات السرطان.

الكشف بمرنان سطح البلازما والرافعة المكروية يمكن أن يؤمن لنا الأمل الأخير في مجال هذا النمط من التحليل الذي يحتاج إلى حساسية عالية جداً. ولكن فإن الأهمية الكاملة لهذه التقنيات في المسح بالدفق العالي ماتزال بحاجة لأن تطور بشكل كامل.

هـ) مصفوفات الخلية Cell Arrays

أنماط المصفوفات الموصوفة سابقا تسمح بمعايرة تفاعلات جزيئية مفردة نوعية عن طريق المسح بالدفق العالي، ولكن لا تأخذ بالحسبان البيولوجية المعقدة المتعلقة بكامل الخلية الحية.تم تطوير المعايرات المعتمدة على الخلية للسماح لمثل هذه الدراسات وكذلك السماح لضبط ومراقبة العمليات الجزيئية آليا داخل الخلية وتغيرات وظائف الخلية بطريقة متوازية.[٥٦]

يتم تنقيط أنماط مختلفة من الخلايا على سطح داعم في مصفوفات الخلية هذا السطح الداعم معدل؛ ليحفز الالتصاق الخلوي. من الأغلفة النموذجية لتحسين الالتصاق الخلوي مبلمرات مشحونة مثل عديد الليسين أو مكونات نسيج خارج خلوي مثل النكتين الليفي أو الكولاجين.الركائز المطلية متوفرة تجاريا أو يمكن أن تحضر محليا بكلفة مقبولة.

من أجل زيادة المعطيات والنوعية من المسح بالدفق العالي مع مصفوفات الخلية يتم تصميم المصفوفات التجمع وتحلل عدة نقاط معلومات من كل خاصة، إما بمعايرات متعددة أو متعددة البارامترات.تسمح معايرات الخلية متعددة البارامترات، غالباً ماتسمى معايرات عالية المحتوى، بتحليل بارامترات متعددة من نمط خلية واحد.يتم إنجاز هذه المعايرات عادة باستخدام صفائح مؤتمتة ومجاهر عالية الدقة للتعامل مع كل بارامتر مطلوب قياسه.تسمح المعايرات المعتمدة على الخلية المعقدة بقياس كل نمط خلية موجود عند موقع مسبار[١٦].هذا النمط من معايرة الخلية له ميزة لمجال أوسع من النمط المعايرة متعددة البارامترات، لكن لها بعض المحدودية المحتملة.أولاً، أنماط الخلية المختلفة الموجودة يجب أن تنمو أو على الأقل تنجو تحت مجموعة معروفة من الشروط.ثانياً، بما أن أنماط الخلية المختلفة تتشارك بنفس البيئة خارج الخلوية فإنه يوجد احتمال للاختلاط، لذا فإنه يحدث تنازلات بالنسبة للقياسات المأخوذة من المصفوفة.أخيراً، إن تطوير المعايرة المطلوب (تقنية وطريقة) لتعديد لمعايرة معتمدة على الخلية هو تطوير فريد من نوعه. يجب أن يتم أمثلة الإشارة المطلوب تحليلها من كل نمط خلوي مفرد بشكل أن يكون من الممكن كشف وتحديد كمية كل النتائج بنفس الوقت تحت نفس الشروط.

أكثر الاعتبارات أهمية في تصنيع المصفوفات الخلوية هو في اختيار نمط الخلية المطلوب تشكيل مصفوفة منها.من حيث المبدأ يمكن اختيار الخلايا الرئيسة (المأخوذة مباشرة من المتعضية الحية) أو خطوط خلوية معدلة (مزارع من أنماط خلوية معينة محولة بشكل يسمح بنموها وإعادة إنتاجها بشكل مستمر).إن الخلايا الرئيسة من مصدر بشري هي أكثر الأنظمة النموذجية صلة فيزيولوجياً، وهو مثير للجدل، للمعايرات في المجال الطبي الحيوي وأنماط الخلية الأساسية البشرية متوفرة تجارياً بشكل واسع. ولكن بشكل عام لايمكن الحصول على الخلايا الرئيسة بمقياس ضروري للمسح بالدفق العالي، لذلك فإن خطوط خلوية محولة من مصدر بشري هي الأكثر استخداماً في صفائح المسح بالدفق العالي المعتمدة على الخلية.

يمكن أيضاً للخطوط الخلوية أن تهندس؛ لتعبر أو تعبر بشكل مفرط عن الدنا المتمم أو بروتين الهدف[٥٧]، ويمكن أن تستخدم في تصنيع وإنتاج مايسمى بمصفوفات الخلية المكروية transfected. إن تصنيع هذه المصفوفات المكروية مختلف عن الوصف الأعلى، والذي يتضمن طباعة كميات نانومترية من الدنا المتممة، والتي تحتوي على بلازميدات على سطوح الشرائح الزجاجية باستخدام جهاز تصفيف ميكروي آلي.ثم تعرض المصفوفات المطبوعة قليلاً لكواشف transfection لبيدي مما يؤدي إلى تشكل معقدات دنا- لبيد على سطوح الشرائح.يتم إضافة الخلايا مع وسطها فوق الدنا المتممة المصفوفة، ويتم أخذ البلازميدات، ومن ثم تصبح transfected.للمصفوفات تطبيقات هامة في اكتشاف الأدوية كطريقة لمسح المنتجات الجينية المتعلقة بالعمليات البيولوجية ذات الأهمية الصيدلانية وكمصفوفات بروتين مكروية في الموقع؛ لتساعد في تطوير وتقييم مركبات صيدلانية.

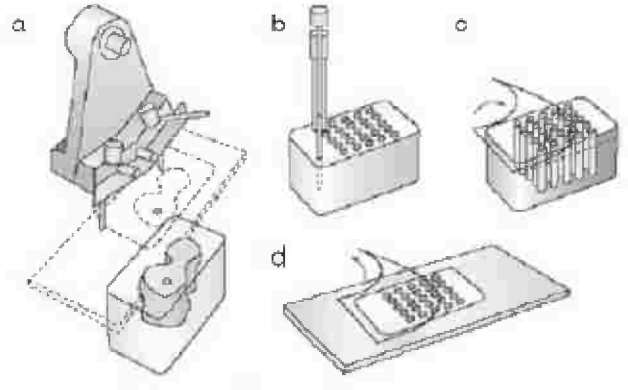
و) مصفوفات النسيج Tissue Microarrays

إن تحليل الأنسجة البشرية على مقياس كبير هام في عدة مجالات من الأبحاث الطبية والتشخيصية.وهذا صحيح بشكل خاص بالنسبة لأبحاث السرطان حيث هناك آليات مختلفة عديدة تدخل في تطوير الورم، وينتج عنها أعداد كبيرة من الأورام الواجب تحليلها في الدراسات للحصول على صورة كاملة لكل تحت الأنماط الجينية لنوع الورم المدروس. الطرق السابقة لتحليل الأنسجة كانت تعتمد على إما عينات نسيج مجانسة- طريقة لاتعطي بالضرورة نتائج نوعية لأنماط خلية مفردة- أو تحليل بمقاطع نسيجية تقليدية وهي جهد بطيء ومستهلك للنسيج.إن مصفوفات النسيج الميكروية والتي فيها مقاطع صغيرة من عينات النسيج مصفوفة على شرائح زجاجية تسهل بشكل كبير، وتسرع هذا النوع من التحليل.

يتضمن تصنيع مصفوفات النسيج الميكروية عدة خطوات (الشكل رقم ٤.٤)٥٨.أولاً تؤخذ خزعات إبرية لبية (عادة ذات قطر 0.6 mm مساحة سطح 0.282 mm2) من مكعب متبرع للنسيج (إما مكعب نسيج مغروس بالبارافين أو عينة نسيج

مجمدة)، وبذلك معاد غرسها في ثقوب مسبقة الصنع لمكعب بارافين فارغ لآخذ بمسافات بين ٠,٢ و ٠,٨ ملم (انظر للشكل رقم ٤,٤).ثم يتم استخدام ميكروتومز نظامي لقطع مقاطع من المكعب الآخذ ويتم نقل المقاطع إلى شرائح زجاجية بمساعدة فيلم ناصع.

ستملك مصفوفة النسيج النموذجية حوالي ٦٠٠ عينة في شريحة المجهر الزجاجية القياسية، ولكن يتم تطوير إبر جديدة والتي تسمح بوجود حتى ٢٠٠٠ خاصة أو أكثر في الشريحة[٥٩].النوعية النهائية للمصفوفة تعتمد بشكل كبير على مهارة الشخص الذي يقوم بتركيبها ومن الصعب التوليد المتكرر لنتائج قياسية للمقارنة الكمية بين الأنسجة بنفس المصفوفة وحتى أنه من الأصعب التفكير بمقارنة مصفوفات مختلفة حتى عندما تركب بنفس المواد.عينات المراقبة من نفس عينات النسيج أو الخطوط الخلوية توضع عادة على كل مصفوفة لأغراض مقارنة وهي ضرورية أيضاً لمعايرة قارئ المصفوفة.



الشكل رقم (٤,٤). تصنيع مصفوفة النسيج الميكروية (a) ألباب نسيج أسطوانية (عادة قطرها ٠,٦ ملم) تم نزعها من مكعب بارافين تقليدي (متبرع) باستخدام مصفف نسيج ميكروي (b) يتم إدخال هذه الألباب بثقوب مسبقة الصنع موجودة في مكعب بارافين فارغ (آخذ) (c) تستخدم ميكروتومات عادية لقطع مقاطع مصفوفة نسيج مكروية (d) استخدام نظام شرائح مطلي باللاصق؛ لتسهيل نقل مقاطع مصفوفة النسيج المكروية إلى شريحة وتخفيض فقدان النسيج ما أمكن وبالتالي زيادة عدد المقاطع الممكن أخذها من مكعب TMA.

تسمح مصفوفات النسيج المكروية بالكشف المتزامن لأنواع الدنا أو الرنا الرسول (mRNA) بالفلورة بالتهجين في الموقع (FISH) وأهداف بروتينية بالكيمياء النسيجية المناعية (IHC)[٦٠]، ولكن حالياً أعاقت عملية قراءة مصفوفة النسيج هو عامل قصور استخدام حاد. والسبب أنه يجب إجراء أي تحليل بمنطقة ممثلة بجد لموقع الخاصة.مثلاً، إذا كانت المصفوفة المكروية المراد تحليلها مشكلة من نسيج ورمي فإن طريقة الكشف يجب أن تميز بين القياسات المجراة على خلايا خبيثة، وتلك المجراة على مكونات نسيج غير خبيثي (أي التهابية أو سدى أو ظهارة غير ورمية)، والتي يمكن أن تعيق ناتج التحليل.

تبدو بعض الطرق على أنها تتغلب على هذه المشكلة: ١) تحليل الصورة المتفلورة الكمية (QIFA)، والتي تستخدم معلمات فلورة مختلفة لتميز بين أنماط الخلية وتحدد حجيرات تحت الخلوية ٢) كشف الفلورة المناعية المباشر المضاعف المتزامن والذي يستخدم اختبار واحد ومستضد مرجعي واحد؛ لتطبيع المحتوى الخلوي من البروتين القابل للكشف في كل موقع مسبار.بالرغم من أن هذه الطرق تحسن حساسية المعايرة فإنها أيضاً تشمل تطوير وتقييم بروتوكول التلوين المعقد — عملية مرتفعة الثمن ومستهلكة للوقت.لهذه الأسباب فإن التطور في التلوين بالجسيمات النانوية وأنظمة الكشف الخالية من الوسم (انظر الفقرة القادمة) يمكن أن تدفع البحث في هذا المجال إلى الأمام، وتساهم في تطوير أنظمة كشف أكثر حساسية قادرة على تقديم نتائج بمستويات أعلى من التكرارية.

ثالثاً: صفائح المسح الدقق غير الموضعي Nonpositional HTPS Platforms

كل أنظمة المصفوفات التي تم مناقشتها آنفا هي معرفة كأنظمة متموضعة. حيث الخاصة في مصفوفة تعرف على أساس بعدين (إحداثياتها X و Y) بالنسبة إلى نقطة

ثابتة على الشريحة معينة من قبل قارئ للصفيحة.يشير كشف إشارة عند إحداثيات X-Y أن حادثة ما قد حصلت عند هذه الخاصة ومن شدة الإشارة الحاصلة يمكن تحصيل فكرة كمية عن كمية التفاعل الحاصل.هذا النوع من المصفوفات له محدودية، بما فيها صعوبة أتمتها وتصنيعها، و حجوم العينات اللازمة لتعمل، و قابليتها للتمييز، وتعقيد الجهاز اللازم للكشف.

لهذه الأسباب لا يزال العمل قائماً على تطوير طرق جديدة لتصنيع وتطبيق المصفوفات، بعض هذه الطرق غير تموضعية، ولا تعتمد على حيز الموقع للخاصة لتعطي معطيات مفيدة.من هذه الطرق الرديفة غير التموضعية نظام التعرف ذو اللاجن المؤتمت (ALIS automated ligand identification system)، و مصفوفة الليف الضوئي المعتمدة على الحبيبات، و مصفوفة المعلقات.

أ) نظام التعرف على اللجين مؤتمت

Automated Ligand Identification System

ALIS هو طريقة من طرق HTPS والتي تسمح بتحليل تفاعل جزيئات صغيرة (يمكن أن تكون أدوية مرشحة) مع بروتينات هدف معينة على أساس قياس الوزن الجزيئي.تبدأ الطريقة بمكتبة من مئات إلى آلاف مركبات عضوية صغيرة (أدوية مرشحة) بشكل محاليل و تم حضنها مع بروتين هدف أيضا بشكل محلول. بعد الحضن يتم تمرير المحلول عبر عمود استقصاء ميكروي القياس، والذي يفصل البروتين ولاجناته المرتبطة من المكتبة المتبقي للجزيئات، والتي لم تتفاعل مع الهدف.

ثم يتم معالجة محلول معقد لاجن — بروتين بفصل المعقد ثم يمرر المحلول الناتج عبر عمود كروماتوغرافيا ذي طور سائل عكسي ميكروي للتركيز قبل أن تمرر إلى مطياف كتلة ؛ للتعرف على بنية للاجن الموجود.بما أن لكل لاجن كتلة جزيئية مميزة فإن تحليل طيف الكتلة للمزيج يمكن أن يكشف عن هوية اللواجن المتفاعلة مع

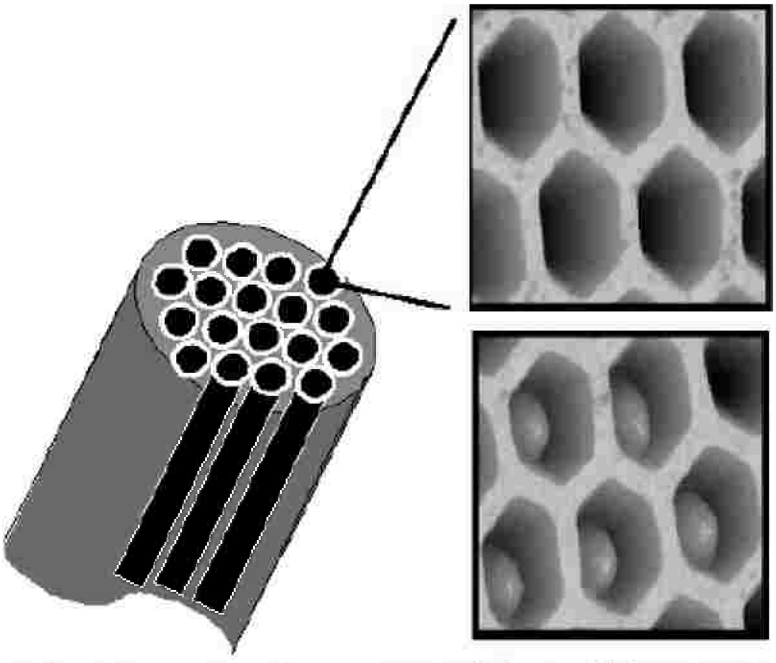
الهدف.يمكن التعرف على الأدوية المرشحة بأنها تلك التي لها أوزان جزيئية تطابق الذرى المرئية في طيف الكتلة.هذه الصفائح يمكن أن تمسح حتى ٣٠٠ ألف مركب باليوم مع استهلاك أصغري للبروتين وتستخدم بشكل واسع في علم العقاقير.

ب) مصفوفات الليف الضوئي Fiberoptic Arrays

تتألف مصفوفات الليف الضوئي من حزم من آلاف الألياف الضوئية المتداخلة كل واحد منها يمكن التحكم به بشكل مفرد وتعديله بأنواع جزيئية مختلفة والتي تحمل رمز فلورة نوعي يسمح بالكشف عنه نوعياً[٣١]، [٦١- ٦٣].قبل أن نبدأ بوصف هذه المصفوفات من المهم أن نراجع بشكل مختصر المبادئ الأساسية للألياف الضوئية.

يتألف الليف الضوئي (قطره ٣- ١٠ ميكرومتر) من لب بلاستيكي أو زجاجي محاط بمادة مغلفة، يمكن للب الليف أن ينقش بشكل اصطفائي عند أحد نهايتيه، بشكل شكلا ما من بئر ميكروي قادراً على استضافة أنواع جزيئية "غرويد" أو حتى خلايا إذا تم تعديله بكيمياء سطح كافية (الشكل رقم ٤.٥).إذا كانت الأنواع الموصولة موسومة بالفلورة، فإنه يمكن استخدام الليف الضوئي أيضاً كأداة تحسس معتمدة على الفلورة عندما يتم توصيل ضوء له طول موجة مثارة ملائمة عبر الليف وتتفلور جزيئات مؤشر الفلورة.يمكن للضوء الصادر أن يؤسر من قبل نفس الليف ثم يرسل مرة ثانية للكاشف.

يمكن بناء مصفوفة من الألياف الضوئية بتداخل آلاف من الألياف الضوئية المفردة بحزمة محزومة بكثافة.تم تطبيق هذه الطريقة لبناء مصفوفات الدنا، والتي يتم فيها تعيين مكتبة من الكريات الميكروية (نظام فك الرموز) بشكل مفرد بمتفلورات كل منها يحمل قليل النيوكلوتيد نوعي على سطحها، وتم تثبيتها على نهايات لب الألياف.



الشكل رقم (٤,٥). مخطط لحزمة ألياف (يسار) صورة ميكروية لقوى ذرية لحزم ألياف محفورة (الأعلى). كل بئر له قطر ٣ ميكرون. يمكن تعبئة الآبار بكريات ميكروية متممة مشتقة من كيميائيات تحسس مختلفة (الأسفل).

تحدث عملية التثبيت على نهايات اللب بشكل عشوائي، وتسجيل موضعي لكل كرية ضروري قبل استخدام المصفوفة. مصفوفات الليف الضوئي المحبية تختلف بشكل كبير عن المصفوفات المتموضعة الموصوفة سابقاً بأن موضع كل مسبار في المصفوفة ليس مسجلاً بتموضع متعمد خلال تصنيع المصفوفة، ولكنها مسجلة طيفياً بعد توزيعها العشوائي على نهايات اللب.تستخدم هذه المصفوفات بطريقة مشابهة للمصفوفات التموضعية. يجب أن توسم جزيئات الهدف بالفلورة، ويمكن كشف فلورتها من قبل الألياف الضوئية بآبار حيث يحصل عندها التهجين.

يمكن أن تستخدم صفائح مصفوفة الليف الضوئي أيضاً؛ لتصنيع مصفوفات الـ HTPS المعتمدة على الخلية.يمكن توضيع الخلايا الحية في الآبار المنقوشة على نهايات

اللب.يجب ترميز هذه الخلايا بالمتفلورات؛ لتسجيل تموضع كل نمط خلوي نوعي.وذلك باستخدام مجال من جزيئات الفلورة أو بتغيير نسب المزيج يمكن التعامل مع خطوط وسلالات خلوية مختلفة ومتعددة بالتوازي مما يسمح بقياسات متكررة وغير راضة للاستجابات الخلوية.

ج) مصفوفات المعلقات Suspension Arrays

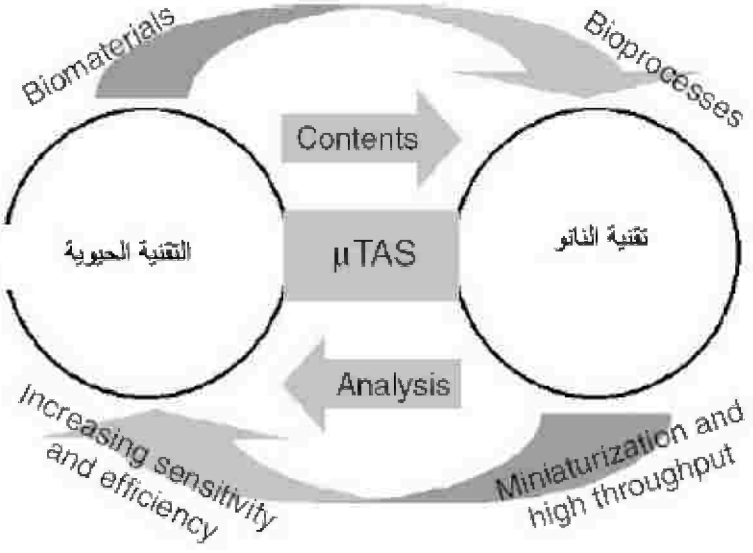
إن مصفوفات المعلقات المعتمدة على الحبيبات تأخذ بشيوع بشكل متزايد كوسائل للتطبيقات التشخيصية والمسحية.يمكن قرن الحبيبات المعنونة بلاجينات أو قليل النيوكليدات أو أضداد مفيدة في مجال التشخيص أو المسح.يتم ترميز الحبيبات بالقضبان بدمج كل من النقاط الكوانتية والمتفلورات أو حتى على أساس الحجم والبنية الفيزيائية بحيث يمكن التعرف عليها.الجزيء الهدف الذي سيتم عنونته يمكن أن يوسم وتعرف النتائج، ويتم تأكيدها بطريقتين: ١) من حيث الحبيبة النوعية الداخلة بتأكيد هويتها و ٢) تأكيد أن التفاعل قد حصل ومداه عن طريق التوقيع المفلور للهدف[٤]، [٣١].

إن أنظمة التفسير وجمع المعطيات للتعامل مع النتائج من هذه الأنواع من المصفوفات يمكن أن يأخذ أشكالاً عديدة حسب طريقة ترميز الحبيبة بالقضبان.في حالة المتفلورات فإنه مايستخدم بشكل روتيني هو جهاز التدفق الخلوي.أو يمكن استخدام أيضاً مجهر بؤري مسحي آلي.بغض النظر عن طريقة الترميز فإنه ينتج عن هذه التقنية مصفوفات التي هي بشكل كبير أكثر مرونة وأكثر طواعية للـ HTPS من التقنيات التموضعية المذكورة سابقاً.ولكن طرق فك الترميز القوية قادرة على التعامل مع كل رمز حبيبة بشكل مفرد، وهذا ضروري للـ HTPS، ومايزال ذلك تحت التطوير حالياً.

رابعاً:الأنظمة الكهربائية الميكانيكية الميكروية وأنظمة السوائل الميكروية وأنظمة التحليل الكامل الميكروي

Microfluidics, Microelectromechanical Systems, and Micro Total Analysis Systems

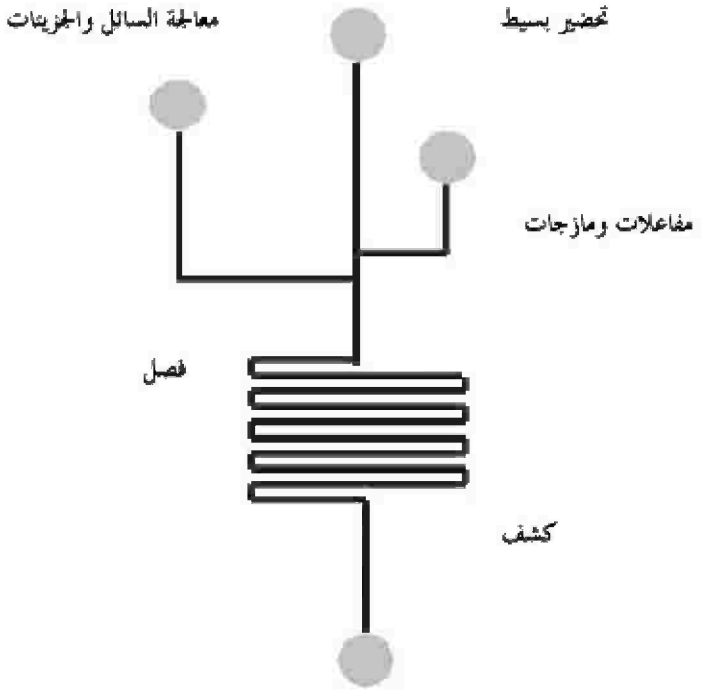
إن تقنية السوائل الميكروية هي قيد التطوير، وهي تشمل نقل ومناورة كميات ضئيلة جداً من السوائل عبر أقنية ميكروية، والتي يمكن تصنيعها بشكل رقاقة (تسمى أنظمة كهربائية ميكانيكية نانوية وميكروية [MEMS, NEMS] على التوالي).فبمساعدة السوائل الميكروية فإن الخطوات المختلفة لتطبيق المصفوفات بالتشخيص أو المسح يمكن تكاملها ؛ لتصبح أجهزة صغيرة تشبه مخابر مؤتمتة مصغرة (الشكل رقم ٤.٦).



الشكل رقم (٤.٦). µTAS الربط البيولوجي والتقنية النانوية.

تم تسمية هذه الطريقة بنظام التحليل الكامل الميكروي (µTAS) أو تقنية مخبر على رقاقة[٦٤،٤٠،١١] يجب أن تحتوي مثل هذه الأنظمة عناصرَ لما قبل المعالجة والفصل وما بعد المعالجة وكشف العينات الشكل رقم (٤.٧).إن مزايا الـ µTAS في

التشخيص والـ HTPS تتضمن ١) تحسين الأداء وسرعة في التحليل وسعة ٢) انخفاض في الكلفة (أحجام عينات صغيرة جداً واستهلاك أقل للكواشف) ٣) تكامل وتعقيد بالاستطاعة.لكن حالياً ماتزال هذه الطرق النانوية والميكروية تحمل محدودية تحليلية معينة، مثل فعالية مزج ضعيفة، وضبط ضعيف للسوائل في القنوات الميكروية وحساسية كشف منخفضة.إذا أخذنا بعين الاعتبار ما للتذبذب في حجوم تفاعل صغيرة من تأثير كبير على نتائج التحليل فإن هذه الخواص ستؤدي إلى انخفاض في مصداقية الاختبارات المجراة بهذا النظام.



الشكل رقم (٤,٧). تقنيات ومكونات مفتاح التي يجب أن تدخل في μTAS.

يشمل تصنيع الـ MEMS عمليات التي هي شائعة أيضاً في تصنيع عناصر الكترونية ميكروية، أي النقش الضوئي والتصنيع الميكروي السطحي للحصول على بنى ذات تفاصيل متشابكة (جدران شاقولية أو غرف أو حزم حرة الانتصاب أو حجب أو أقنية أو صمامات ...إلخ) وترسيب أفلام رقيقة للحصول على سطوح خاصة لتثبيت الكيماويات الحيوية.تم تطوير عدد من μTAS[٤٠-٧٠]،[٦٥] لمخبر الطبي الحيوي:

رقاقات الدنا للرحلان الكهربائي الشعري الميكروي من أجل الجينوم — تنشأ هذه المصفوفات باستخدام التصنيع الميكروي السطحي على الزجاج أو البلاستيك أو السليكون؛ لإنشاء شبكة من الخزانات والأوعية الشعرية.يؤدي تطبيق جهد عبر مثل هذه الخزانات إلى جريان السائل ضمن الأوعية الشعرية الميكروية.المواد القابلة للتحليل مثل شدف الدنا المنحلة يمكن أن تنفصل حسب حركيتها الرحلانية (وهي تابع لطول الشدفة).تسمح الخزانات الإضافية المتصلة بأنابيب شعرية ميكروية متقاطعة بجريان موجه للسائل، وبالتالي معالجة متحللات نوعية إلى محطاتها الكيميائية التابعة لها.

رقاقات تفاعل سلسلة البوليمرات للجينوم — هذه الأجهزة تجمع بين تحليل الدنا والـ PCR في الموقع لتضخيم الدنا[٦٨].

رقاقات الرحلان الكهربائي الشعرية الميكروية للبروتينات — تسمح هذه الأجهزة بفصل البروتينات بالرحلان الكهربائي مجتمعة مع كشف بالمطيافية الكتلية عبر مصدر تأين للرذاذ الكهربائي المصنع ميكروياً.إن في هذه أنظمة مصفوفات البروتين الميكروية تقنية التحليل البروتيني المعتمد على الطاقة أقل تطوراً بكثير من تلك للجينوم.أنظمة سائلية ميكروية لتحليل مزيج من المستقلبات — تتضمن هذه المستقلبات السكر وحمض البول وفيتامين C (حمض الاسكوربيك...إلخ).

رقاقات معتمدة على الخلية للخلية — هذه الأجهزة تسمح بضبط HTPS للتغيرات الفيزيولوجية المحرضة بالتعرض لاضطرابات بيئية.

خامساً:مناحي جديدة في أنظمة الكشف New Trends in Detection Systems

أ) أنظمة وسم جديدة: جسيمات نانوية ونقاط كوانتية

New labeling Systems: Nanoparticles and Quantum Dots

تسمح التطورات الحديثة للتقنيات النانوية بمدخل إلى أشكال مختلة من المواد ذات البنية النانوية.بمناورة البنى بأبعاد على المستوى النانوي، نستطيع ضبط وتفصيل خواص المواد ضمن هذه الأبعاد، بطريقة متوقعة لتؤمن الحاجة لتطبيقات نوعية، مثلا، البلورات النانوية من أنصاف النواقل و القشرة النانوية المعدنية.وبشكل خاص فإنه يمكن للتقانة النانوية أن تسمح بتطوير وتطبيق التصوير الضوئي، والتحسس الحيوي بتأمين كواشف أكثر تباينا وقوة ومسابر فلورة و مواد تحسس.

بالإضافة لذلك، فإن المقياس الحجمي لمثل هذه المواد النانوية له فوائد بالنسبة للكثير من تطبيقات الطب الحيوي. حقيقة أن الكثير من الجسيمات النانوية مشابهة في الحجم (≤ ٥٠ نانو متر) للجزيئات الحيوية الشائعة مما يوفر إمكانية الاستفادة منها بالتعليم داخل الخلية، وكذلك من اعتبارهم مرشحين مفيدين لتطبيقات الاقتران الحيوي مثل استهداف الأضداد.في العديد من الحالات، من الممكن أن نجري تعديلات على البنى النانوية ؛ لتلائم أكثر تكاملها مع الأنظمة الحيوية: مثلا، يمكن أن نعدل سطح ما بطريقة تعزز انحلاليته المائية، أو تنافسيته الحيوية أو التعرف الحيوي. يمكن أيضا أن نزرع بنى نانوية في مواد حيوية تنافسية ؛ لتأمين مركبات نانوية ذات خواص فريدة[٢٦].

لماذا نستبدل المعلمات الجزيئية التقليدية مثل المتفلورات بالبنى النانوية؟ تعاني المعلمات المتفلورة الحالية من مساوئ ملازمة لها هامة بما فيها الحاجة إلى ليزرات ذات ألوان مناسبة و بهتان الفلورة حتى بعد استخدام واحد.وكذلك إن عملية الكشف يمكن أن تفتقر للتمييز عند استخدام عدة أصبغة في تحاليل متعددة بسبب ميل الأصبغة

المختلفة للسيلان مع بعضها.بشكل نموذجي فإن المواد ذات البنى النانوية لها صفات ضوئية أعلى بكثير من الأصناف الجزيئية التي ستحل محلها- فعالية كوانتية أعلى أو تبعثر أكبر، أو تصالب امتصاص و فعالية ضوئية على أنظمة أطوال موجة أكثر تنافسية حيوية، ومن ثم ثباتية كيميائية أعلى أو ثباتية ضد القصر الضوئي.

بالإضافة لذلك، تملك بعض البنى الناوية خواصا ضوئية تعتمد بشكل كبير على حجم الجسيم أو أبعاده.يمكن لمثل هذه الجسيمات أن تربط بجزيئات حيوية؛ لتشكل مسابر حساسة طويلة العمر يمكن استخدامها في عمليات التعرف. هناك أمثلة ناجحة عن مثل هذه البنى النانوية، والتي تم تطبيقها في عمليات الكشف في مجالي التقانة الحيوية والطب مثل النقاط الكوانتية (quantum dots) وجسيمات الذهب النانوية المقترنة حيويا (bioconjugate gold nanoparticles)وجسيمات طنين بلاسمي من الفضة (silver Plasmon-resonant particles).

إن النقاط الكوانتية عالية الامتصاص للضوء.إن إضاءة الجسيمات النانوية التشرع بالامتصاص والإصدار الأعظمي تنتقل إلى طاقة أعلى مع انخفاض قياس الجسيم بسبب أفعال الحجز الكوانتية.[٦] النقاط الكوانتية هي بلورات نانوية فعالة نموذجية في القياس يتراوح قطرها بين ٢ إلى ٨ نانومتر.خلافا للمتفلورات الجزيئية، والتي لها نموذجيا طيف إثارة ضيق جدا، فإن البلورات النانوية نصف الناقلة (semiconductor nanocystals) تمتص الضوء بمجال طيفي واسع جدا.مما يجعل من الممكن إثارة طيف واسع من النقاط الكوانتية "ألوان" باستخدام طول موجة ليزرية مهيجة وحيدة والتي يمكن أن تؤهل مسباراً واحداً لعدة معلمات بنفس الوقت للتطبيق في مجالي المعايرة والتحسس الحيوي (biosensing).و أكثر من ذلك فإن خواص الإضاءة للنقاط الكوانتية كذلك حساس أيضا لبيئتها المحلية وحالة السطح.باستخدام هندسة قشرة لبية حيث تكون البلورة النانوية مغلفة بقشرة بنصف ناقل له نطاق فرجة أعرض

(wide band gap semiconductor) وتم بذلك التوصل إلى تحسينات أخرى في الفعاليات الكوانتية المتفلورة (<٥٠٪) والثباتية الكيميائية الضوئية لمثل هذه المواد.

قد تم تسجيل تطبيقات التصوير المفلور متعدد الألوان للمصفوفات باستخدام نقاط كوانتية كنظام وسم[٧١]، ويمكن زرع النقاط الكوانتية داخل جسيمات النانوية أو الميكروية معتمدة على المتبلمرات لترميزها بالقضبان للاستخدام في مصفوفات معلقات معتمدة على الرؤوس.يمكن استخدام مجموعة من الألوان والكثافات للنقاط الكوانتية لهذه الأغراض ؛ لتوليد مكتبات تجميعية فعالة.

وقد استخدمت أيضا جسيمات الذهب الغروئيدية النانوية لوسم جزيئات هدف كنتيجة لخواصها الضوئية القوية.وتملك أيضا مزية كونها متعددة الإمكانيات من حيث الاقتران الحيوي، ويمكن تعديل سطوحها بسهولة بتيولات وظيفية لإدخال مجموعات كيميائية فعالة قادرة على التفاعل مع الجزيئات الحيوية[٦].

مثال خاص عن تطبيقات الجسيم النانوي للذهب في دراسة تفاعلات الجزيئية الحيوية (مثلا، تهجين الدنا ومستقبلات البروتين) وفيها كل صنف يقترن بجسيم ذهب والزوج المتمم يمكن تمييزه على أساس خواصه الضوئية المختلفة بالنسبة لكل صنف بمفرده.لأن غرويد الذهب له خاصية امتصاص الضوء قوية جداً فإن هذه الطريقة اللونية حساسة بما يكفي للكشف عن التراكيز الصغير ة التي تصل إلى 10 fmol من جزيء حيوي موسوم.هذه الطريقة أكثر حساسية تقريباً بخمسين مرة من طريق كشف التهجين الشطائري المستخدم مع المتفلورات الجزيئية.جسيمات طنين بلاسمي من الفضة استعملت أيضاً كواسمات في دراسات تهجين الدنا المعتمدة على المصفوفات الميكروية والمعايرات المناعية الشطائرية[٦].يتألف جسيم من لب جسيم نانوي من الذهب، والذي تنمو عليه قشرة من الفضة، ويمكن أن نربط به جزيء حيوي.جسيمات من هذا النوع يتراوح حجمها من ٤٠ إلى ١٠٠ نانومتر لها خواص

بعثرة ضوء قوية وتسمح لها بأن تعمل كمصادر نقاط محدودة الانكسار والتي يمكن أن تشاهد باستخدام مجهر حقل مظلم عياري بإضاءة ذات ضوء أبيض.عند استخدامها كواسمات في المعايرات المناعية أو معايرات التهجين فإن النتائج تحدد بعد عدد الجسيمات المرتبطة بالركيزة بواسطة المجهر. في معايرات تهجين بالدنا باستخدام مثل هذه الطريقة فإن حساسية الكشف كانت بحدود ٦٠ مرة أكثر من تلك الممكن الحصول عليها نموذجياً باستخدام واسمات فلورة تقليدية.

ب) أنظمة كشف خالية من الوسم Label-Free Detection Systems

في السنوات الحديثة تم تكريس جهود عالية؛ لتطوير أنظمة كشف خالية من الوسم للاستخدام في أنظمة المصفوفة الميكروية والـ HTPS.تم وصف طرق كشف معتمدة على الرافعة الميكروية، والأسلاك النانوية في الأدبيات.

تقيس الرافعات الميكروية القوى المؤثرة على حافة حادة عندما تقترب من هدف معين له سطح معدل بجزيئة حيوية (مستقبل)[٧٢].بشكل محدد عندما تقترب الحافة من الهدف تؤثر قوى ميكانيكية نانوية عليه مما يسبب بانحناء الرافعة. يمكن كشف هذا الانحناء بواسطة ليزر قادر على كشف تشوه صغير يصل إلى جزء من النانومتر. هذا التشوه متناسب مع قوة التفاعل، ولهذا يسمح أيضاً بقياسات كمية يمثل هذه الأنظمة. مما يجعل الرافعة الميكروية طريقة مفيدة واعدة للـ HTPS.

تشكل الرافعات ٠,٠١ من حجم نظيراتها الكبيرة (موازين كبيرة ذات بلورة كوارتز)، ويمكن إنتاجها تجارياً كمصفوفات حساسة مصغرة بالتقنيات الحالية.رافعات النتريد وأكسيد السليكون والسليكون متوفرة تجارياً. تملك هذه الرافعات أشكالاً وأبعاداً مختلفة وحساسيات قوى مختلفة قادرة على قياس في مجال $١٠^{-١١}$ N عند مستويات من التفاعلات الجزيئية المفردة.حساسات معتمدة على الرافعات متعددة الوظائف بشكل كبير يمكن أن تعمل في الهواء أو في الخلاء أو في بيئات سائلة، ويمكن

أن تحول عدداً من الإشارات المختلفة، مثلاً مغناطيسية وجهد وكهربائية وحرارية وكيميائية، وكتلية، وتدفق إلى استجابات ميكانيكية.

إن طبقة المستقبل المرسبة على سطح الرافعة مباشرة تؤثر على اصطفائيتها وتكراريتها ودقتها.من المفضل أن نرسب طبقة رقيقة (لتجنب التغيرات في الخواص الميكانيكية للرافعة) متجانسة (لتوليد جهد متجانس) ومضغوطة (لتجنب التفاعلات مع الركيزة الصلبة في الطبقة السفلى) من جزيئات المستقبل عند الحافة وسطح التغليف يجب أن يكون ثابتاً ومتيناً مع جزيئات متصلة تسانديا مع السطح مع احتفاظها بحرية كافية للتفاعل مع اللاجن النوعي.يمكن لهذه التقنية أن تستخدم لكشف تهجين الحموض النووية وتفاعل ضد- مستضد وتفاعل لاجن- مستقبل وفعالية انزيمية[٧٣- ٧٥].

يمكن أن تكون مصفوفات الرافعة الميكروية قادرة على معايرة بروتينات متعددة أو حموض نووية بتجربة واحدة أو بفحص تشخيصي واحد. يحضر كل سطح رافعة بطريقة يكون فيها صنف واحد جزيئي نوعي فقط قادر على الارتباط بها.بالرغم من أن هذا النهج مهم ومثير، ولكن الانتقال بهذه التقنية من مرحلة برهان المبدأ الأولية (حيث نحن حالياً وحيث هناك رافعة واحدة مستخدمة في المرة الواحدة) لشكل المصفوفة (حيث توجد بضعة مئات من الرافعات بالرقاقة الواحدة) ليس بالعمل السهل ولكن بحاجة إلى أعمال مستقبلية كبيرة.مهما يكن فإن طموح كبير يحيط بهذه المصفوفات، ونتائج الدراسات الأولية واعدة[٧٦].

يمكن أن تكون الأسلاك النانوية نصف الناقلة هي البديل الآخر للواسمات[١١].الفكرة هي أن جزيء مستقبل (ضد أو دنا وحيدة النسيلة) يمكن أن يرتبط بسلك نانوي فعند ارتباط أي نوع من الهدف تحدث تغيرات يمكن قياسها في ناقلية السلك النانوي.مثل جهاز الكشف هذا له مستقبل؛ لأن يكون عالي الحساسية

(من حيث المبدأ قياس حتى تفاعل جزيء واحد)، ويمكن أن نتخيل بناء مصفوفات متوازية من الأسلاك النانوية حيث تكون كل منها فعالة عند مستقبل مختلف. يمكن لهذا النظام أن يستخدم لقياسات بالزمن الحقيقي بما أنها لاتحتاج بالضرورة إلى وسم الأهداف ويمكن قياس عمليات فيزيولوجية سريعة (تقريباً مدتها ٠,١ ثانية).إن تجميع عدد كبير من هذه الأسلاك النانوية في جهاز سائل ميكروي يمكن أن يكون ميزة أخرى محتملة لتطوير الـ HTPS في المستقبل.

سادساً:المعلوماتية الحيوية Bioinformatics

لقد أدى تعقيد المعلومات وكمياتها المتزايدة التي يتم الحصول عليها من مسح البروتيني والتعبير الـ RNA والوراثي إلى زيادة مرافقة للفائدة المحتملة. وهناك حاجة واضحة للتحليل الحاسوبي لمثل هذه المعطيات وبرامج للتعامل معها. في الواقع لقد أصبحت التقانة المعلوماتية عنصراً هاماً وأساسياً في الأبحاث الأكاديمية والصناعية الأساسية، وكذلك في تطوير المنتج؛ لتسمح باستخلاص المعطيات لهذه المعلومات مع جمع المعطيات، وتفسيرها من أنظمة الـ HTPS[٨،٩،١١].تستدعي مصفوفات الدنا اعتماداً كبيراً على الحاسوبية[٧٧] في:

تصميم المصفوفة — الاختيار المسبق للمادة البيولوجية التي سيتم طباعتها في المصفوفات العادية (استخدام قواعد بيانات ذات علاقة والتي تتضمن معلومات من مصادر مختلفة، والتي تسمح باسترداد فعال للجزيئات الحيوية بالمواصفات المرغوبة).

تحليل الصورة — إن الحسابات الكمية للمعطيات الظاهرة عند كل خاصة بعد مسح المصفوفة (التقاط صورة صحيح، وإدخال الموضع، والكشف الدقيق للخواص ومركزية الخاصة، والقدرة على الكشف عند خواص ذات نوعية سيئة، وتصحيح وتقدير للخلفية).

تخزين وتنظيم النتائج التجريبية – إن المقدرة على إجراء آلاف التجارب التي تشمل آلاف الجينات المختلفة تحتاج إلى بنى من قواعد البيانات فعالة، والتي يمكن أن تخزن النتائج من تجارب المصفوفات، وتسمح باستخلاص المعطيات.

المقارنة بين أشكال المسح – إن تحديد المجموعات التي تملك خواص متشابه (مثلاً مجموعات من الجينات)، تحليل الإحصائي، وتفسير الأنماط المعقدة للمجموعات؛ المتفاعلة لتأسيس شبكة وظيفية[٧٨].

سابعاً: تطبيقات للمسح بالدقق العالي في الطب الحيوي

Applications of HTPS in Biomedicine

أ) الأمراض الجينية Genetic Diseases

لقد استفاد الطب الجزيئي والجيني من التحليل السريع للتنميط الجيني والطفرات وأشكالها وتقنيات تسلسل الدنا[٧٩].بخلاف الطرق التقليدية والتي قدرتها تكمن بشكل رئيس في التعرف على جينات مفردة، والتي يتغير تعبيرها في حالة مرض معين[١٧]، فإن تجارب المصفوفة الميكروية قادرة على التعرف على عدد كبير من الجينات التي تغير تعبيرها بنفس الوقت أو أنها مرتبطة بها كنتيجة للمرض.ولكن هذا غالباً مايؤمن دلائل قليلة لمعرفة أي تغير مهم للتأكيد على نمط ظاهري معين (حالة المرض).يمكن أن يؤدي محرض معين إلى تغييرات في مستويات التعبير للـ mRNA من مئات الجينات وخاصة في الثديات.

في الواقع، فإن القوة الحقيقية لمصفوفات الدنا الميكروية هي في إظهار الأمراض الجينية، وقد تم توضيحها بنماذج تعبير عالمية أكثر من تحديد جينات حرجة مفردة[٨٠-٨٥].أنماط التعبير هذه تشكل أداة جديدة لتقصي أنماط من الأمراض، والتعرف على جينات مرضية جديدة لاضطرابات جينية وحيدة ولخلات معقدة ولعلاقات خليوية

ووظيفية، ولطرق جديدة في تطوير أدوية ذات علاقة[١٣].إن الأدبيات المتعلقة بتطبيق المصفوفات الميكروية في تحديد وإظهار الأمراض الوراثية وفيرة.أمثلة في الأمراض الكلوية[٨٦- ٨٩]، وأمراض كبدية[٩٠]، وأمراض استقلابية، والغدد الصم[٩١- ٩٤] والشيخوخة[٩٥] والطب القلبي الوعائي[٩٦]، والطب الفموي، وطب الأسنان، والطب الوجهي[٩٧]،[٩٨]، وطب الأذن والأنف والحنجرة، وجراحة الرأس والرقبة[٩٩]، والأمراض العضلية[١٠٠]،[١٠١]، والأمراض الرئوية[٨٥]، ونظرية التطور[١٠٢].

لقد أصبح من الواضح أكثر أن تنظيم الجين لايعتمد فقط على تركيب جيني معين، ولكن أيضاً على عمليات التخلق المتوالي. يمكن تعريف عملية التخلق المتوالي بأنها عملية تحويل معلومات الرمز الجيني إلى منج نهائي أي نسخ وترجمة، أو أي عملية تشمل تفاعل المادة الجينية.مثلاً في الإنسان نقص موقع المحرضات المؤكسد بالميثيل يمكن أن يؤدي إلى مرض أو أكسدة بالميثيل للدنا غير طبيعية، وهذا علامة مسجلة للخلايا السرطانية.في الواقع يعتقد أن تسكيت التخلق المتوالي للجينات المثبطة للورم أساس سببي لعدد كبير من سرطانات البشر الفرادي.لهذه الأسباب فإن كشف مواقع الأكسدة بالميثيل وتوليد أنماط الأكسدة بالميثيل في مصفوفات قليل النيوكليتيد الميكروية سيكون على الأغلب هاماً جداً في الطب مستقبلاً[١٠٣].

تؤمن أيضاً أنماط التعبير المولدة من مصفوفات الدنا أدلة هامة عن مكونات البروتين في الخلايا والنسج.بما أن مستويات البروتين والـ mRNA في حقيقيات النواة ليس من الضروري أن تكون مرتبطة مباشرة فمن الضروري لتحليل متمم البروتين في خلية والـ mRNA في نفس الوقت للحصول على مؤشر حقيقي على التغيرات الخلوية المرتبطة بالمرض[٤٢].لذلك فإن مصفوفات الدنا والبروتين يتممان بعضهما[٤٦].

إن الحالة الخاصة للجهاز العصبي المركزي للحيوانات هي حالة مهمة.لو تم تقدير أن أكثر من نصف الجينات يتم التعبير عنها دفعة واحدة بأي وقت، وأن معظم

هذه الجينات توفر الـ mRNA فيها ضعيف بشكل نادر، وهذا نوع من نوعين لهذا النمط من النسيج[١٠٤].إن تعقيد الجهاز العصبي على مستوى الخلايا مفردة وشبكاتها يتعدى تعقيد أنظمة الأعضاء الأخرى.تغطي هذه التعقيدات الفيزيولوجية والفيزيائية ذخيرة مختلفة من الوظائف التي يمكن أن تتغير مع الزمن مثلاً خلال التقدم بالعمر.

إن دراسة التعبير الجيني في الدماغ له أهمية خاصة للعديد من الأسباب، وبشكل تحدي من نوع خاص.إن المصفوفات الميكروية تفتح هذا الموضوع للمرة الأولى بطريقة تجعلنا نبدأ بفهم كيف، ولماذا توجد، وتعمل الأجهزة والأنسجة؟ إن استعراض تطبيق المصفوفات الميكروية في البيولوجيا العصبية[١٠٥] تغطي التنظيم الجينومي للدماغ[١٠٦] وتقدم الدماغ بالعمر[١٠٧] وإصابات الحبل الشوكي[١٠٨] والسمية العصبية[١٠٩] ومرض الزهايمر، وانفصام الشخصية[١١٠]، والاضطرابات العصبية[١١١].

كمثال خاص لدينا حالياً معلومات قليلة عن الجينات المتعلقة بالاضطرابات النفسية.من وجهة نظر علم العقاقير فإنه بالرغم من النجاح الذي حصل في السنوات الأخيرة من حيث تطوير أدوية جديدة معتمدة على تحت نمط من المستقبلات فإنه هناك عدد معنوي من المرضى لديهم هذه الاضطرابات بقوا مقاومين للمعالجة.وأكثر من ذلك فليس هناك طريقة جهازية تسمح بتحديد أي من المعالجات المتوفرة المختلفة ستكون فعالة بالنسبة لمريض ما.وقد حصل تطور محدود في التعرف على أهداف دوائية فريدة وجديدة لمعالجة أمراض معينة.في حالات الاضطرابات النفسية مثل الانفصام والاكتئاب فإنه من الواضح أن مسبب الحالة هو مجموعة من الجينات غير الطبيعية وليس شذوذاً جينياً مفرداً .يجب أن تسمح لنا المصفوفات الميكروية بالتعرف على الجينات وأن نعالج هذه الجينات بنجاح[١٠٤]، [١١٢].

ب) السرطان Cancer

السرطان هو الهدف الرئيس الذي تتوجه إليه تقنيات المصفوفات[١١٣- ١١٥]. تصف مراجعات حديثة عديدة تطبيق المصفوفات الميكروية في حقل علم الأورام، وخاصة سرطان الفم[١١٦]، وسرطان المبيض[١١٧،١١٩]، وسرطان الثدي[١١٣،١٢٠]، والأورام الدموية[١٢١]، والليمفومات[١٢٢].

إن الأنماط المختلفة للمصفوفات الميكروية الموصوفة سابقاً تحمل إمكانية للتطبيق في أبحاث السرطان، وبالتالي في التشخيص والمراقبة. مثلاً المصفوفات الميكروية النسيجية يمكن أن تطبق للمسح والمقارنة في التغيرات الكيميائية الحيوية والجينية الحاصلة في أنسجة ورمية مختلفة (مصفوفات ميكروية لنسيج متعدد الأورام)، والتغيرات الحاصلة في المراحل المختلفة في تطور الورم (مصفوفات ميكروية لتطور النسيج). بالإضافة إلى ذلك، فإن مصفوفات النسيج الإنذارية الحاوية على عينات من أورام من مرضى معروفين أو معطيات المتابعة السريرية لديهم معروفة تساعد بالتعرف على معاملات الإنذار الجديدة أو تربط استجابة للمعالجة الكيميائية لمرضى يتغير بالصورة الجزيئية لديهم[٦٠،١٢٣]. يمكن استخدام مصفوفات قليل النيوكلوتيد الميكروية في علم الأورام لتحري الطفرات، أو لتطوير بصمة متعدد أشكال النيوكلوتيد المفرد (SNP) في مجموعات من الأشخاص المصابين، والتي ستساعد أكثر بربط النمط الظاهري الوراثي للاستجابة للدواء (علم الصيدلة الجيني). مصفوفات الدنا المتممة الميكروية يمكن أن تستخدم لمسح خلل التوازن الجينومي (تضخيم المورثة الورمية أو حذف المورثة المثبطة للورم).

في تحليل التعبير تسمح مصفوفات الدنا الميكروية المقارنة بالنسخ بين الأنسجة الورمية والطبيعية؛ لتوضيح الفروقات بين الأنماط الظاهرية المريضة والطبيعية، وتأمين

مقارنات بين النسخ من مراحل مختلفة من التحولات الخليوية لتقدير مؤقت لتطور الورم وتأمين مقارنات بين النسخ من عينات مختلفة من نفس النمط الورمي لتصنيف تحت الأنواع، وتوصيف استجابة النسخ لعدد من الوسائط الداخلية والخارجية (الصيدلانيات الوراثية والسمية الوراثية)[١٢٤،١٢٥].

بالإضافة إلى ذلك فإن الدراسات البروتينية باستخدام مصفوفات البروتين الميكروية يجب أن تساعد بالكشف عن دور البروتينات في التسرطن، وتساعد في التعرف على بصمة البروتين، وبالتالي تحديد الواسمات الحيوية للسرطان[١٢٦،١٢٧]. حتى الآن مازال استخدام المصفوفة الميكروية في علم الأورام محصوراً بشكل أساسي في البحث والتطبيقات في التشخيص السريري الروتيني والمراقبة مايزال بانتظار حل الأمور التالية:

١- إن الكمية الضرورية من النسيج الورمي لأداء تجربة مصفوفة الدنا (١٠٠ ميلي متر مكعب) عادة كبيرة للحصول عليها من أنسجة مثبتة بالفورمالين. عينات الورم المجمدة بالصعق في النتروجين السائل مباشرة بعد الاستئصال الجراحي لمنع تخرب الـ RNA هي المطلوبة، ولكن غالباً مايكون من الصعب الحصول عليها نظراً للظروف الموجودة في غرفة العمليات. وأكثر من ذلك فإن الخزعات المأخوذة للدراسة تميل لأن تكون صغيرة، وتصغر كلما كان الكشف مبكراً، وتستخدم حالياً طرق بأخذ الخزعة تسبب أقل رض ممكن.

٢- غالباً ماينقص التعرف المحتمل والجمع والتخزين للنسيج عالي النوعية التنظيم الجيد. مما يجعله مقارنة بين المعطيات من مشافي مختلفة أو مجموعات بحث صعباً للغاية. والتعقيد الآخر هو حقيقة أن نوعية النسيج يمكن أن تختلف بين المواقع (حتى بين مخابر في نفس الجهة)، وإن نوعية الحموض النووية خاصة الـ RNA المستخلصة من

الأنسجة يمكن أن تختلف بشكل كبير. بالإضافة إلى ذلك، فإن معلومات سريرية ذات علاقة بخصوص الأنسجة والعينات يمكن أن يكون صعب الحصول عليها بطريقة راجعة بسبب السجلات الناقصة، وأمور السرية المتعلقة بالمريض.

٣- مشاكل اختيار العينات. تمثل الأورام عادة خلائط غير متجانسة من أنواع خلوية مختلفة بما فيها خلايا خبيثة بدرجات مختلفة من التمايز، وعناصر السدى، وأوعية دموية، وخلايا التهابية. يمكن لورمين بنفس المراحل السريرية أن يختلفا بشكل كبير في الدرجة، ومن ثم بالنسب للأنماط الخلوية. يمكن أن تختلف الأورام بدرجات مختلفة في أنماط التعبير الجيني، وأن يتم التعبير عن واسمات مختلفة، إما بالخلايا الخبيثة، أو بالعناصر الخلوية الأخرى. عدم تجانس يمكن أن يعقد تفسير دراسات التعبير الجيني.

ج)علم الأوبئة الجيني Genetic Epidemiology

علم الأوبئة يشمل دراسة أسباب المرض، وتوزعه، وضبطه في المجموعات السكانية. هو علم ملاحظات بشكل كبير، وأهدافه دراسة الناس الذين لديهم مرض، أو ليس لديهم مرض. لمقارنة بين هذه الفئات يحتاج إلى حساب المخاطر (أي احتمال الإصابة بالاعتماد على التعرض) والمعدلات (أي تكرارية المرض بوحدة مجموعة الناس بوحدة الزمن). يعتمد هذا العلم بشكل أساسي على التحليلات الإحصائية، ومقابلات للمجموعات الهدف.

إن صورة تعبير الـ HTPS بمصفوفات الدنا ومقارنات أنماط التعبير الناتجة من أشخاص مختلفين ستساعد حتماً أخصائي الأوبئة الجينية بتأمين واسمات جينية في مجموعات يتم تعريف استعداد الطبيعي والتشخيص والإنذار للمرض منها. الصورة والمقارنة بنفس الوقت ستسمح للمرة الأولى بتحديد فيما إذا كانت الخلافات البيئية أو

الجينية الواسعة في المجموعة البشرية مسؤولة عن أنماط حدوث المرض هذا، والمدى الذي يكون فيه المرض وراثياً يمكن أن نرى نهاية سنوات النقاش حول أي العوامل لها التأثير الأكبر على حدوث أمراض معينة. هذا هام خاصة في علم الأوبئة السرطانية حيث يظن أن الخلافات البيئية تؤثر بشكل كبير على خطر حدوث السرطان في حالات معينة[١٠٣،١٢٨].

د) تنميط الأنسجة Tissue Typing

تنميط النسيج مهم خاصة للتوافق النسيجي خلال زرع عضو ونسيج. إن رفض النسيج الناتج عن عدم توافق نسيجي هو حالة خطرة، ويمكن أن تكون مهددة للحياة. يعتمد التوافق بشكل كبير على قبول المضيف للنسيج المعطى بالمعنى المستضدي، عملياً يمكن الحصول على ذلك عن طريق تنميط مستضد كرية بيضاء بشرية (HLA).

ولكن فعالية التنبؤ برفض التطعيم باستخدام هذه الطريقة بعيد عن الكمال. إن زيادة دقة التنميط النسيجي بإدخال صورة الـ SNP للمتبرع، والآخذ يمكن لتحليل المصفوفة الميكروية أن يخفض من رفض الطعم، وبالتالي يقلل من الحاجة إلى مثبطات المناعة بجرعات عالية ولفترة طويلة، والتي تحمل مخاطر متزايدة بشكل معنوي للمرض والموت لآخذ الزرع[١٢٩]. إن تطوير صورة الـ SNP عبر المصفوفات الميكروية في الإعدادات السريرية سيحتاج لتحديد صور SNP ملائمة، والتي ستؤمن أفضل التوافقات للمتبرع والآخذ؛ لأن بعض الأشكال المتعددة يمكن أن تكون أكثر توليد للمناعة من الأشكال الأخرى.

هـ) الأمراض المعدية Infectious Diseases

إن التشخيص والمعلومات الوبائية المرتبطة بالأمراض المعدية هي حقول إضافية حيث يمكن تطبيق المصفوفات الميكروية وتعطي فوائد للمستقبل[٣]. غالباً ماتكون الطرق

الكلاسيكية للتعرف على الجراثيم معقدة، وتستهلك وقتاً، واستبدالها بمعايرات مسح متعددة حساسة للغاية وسريعة هو هدف أساسي بعلم الجراثيم السريري ومخابر الصحة العامة. مع ازدياد عدد الجينومات الجرثومية التي تم سلسلتها فإن اختياراتنا لتحليل مفصل للأمراض المعدية ومسبباتها تزايد بشكل تصاعدي[١٢]. أمثلة عديدة لتطبيقات المصفوفات الميكروية تم تسجيلها في الأدبيات في مجال علم الفيروسات السريري[١٣١، ١٣٠، ٨٤، ٨٣]، وعلم الأوبئة[١٣١]، والأمراض المعدية[١٣٢، ١٣٣]، واللقاحات[١٣٤] والطفيليات[١٣٥]، والملاريا[١٣٦]، والعوامل الممرضة الجرثومية[١٣٧]، وعلم الجرثوميات البيئية[٣] وتفاعلات العامل الممرض- المضيف[١٣٨].

يمكن لمصفوفات الكاربوهيدرات الميكروية أن يكون لها دور خاص لتلعبه في تطبيقات الـ HTPS في الأمراض المعدية حيث إن معظم الميكروبات تستغل غليكانات الغشاء الخلوي؛ لتحدث خمجاً في خلايا المضيف، ومعظم الزيفانات الجرثومية (كوليرا والدفتيريا والسل) تتألف من سكر وبروتينات مرتبطة بالكاربوهيدرات (لكتينات)[٥٣]. إن مسح تفاعلات غليكان- بروتين بشكل HTPS سيكون موضعَ اهتمام كبيراً للشركات الصيدلانية، ولمراكز الأبحاث الوطنية من حيث تحديد البنى والوظائف لمثل هذه الجزيئات، ولتطوير الأدوية.

و) المعالجة الدوائية:اكتشاف الأدوية وتقييمها

therapeutics: Drug Discovery and Validation

اكتشاف الدواء هو عملية فيها يتم التعرف على مركبات تبدي فعاليات ضد هدف أو وظيفة محددة ثم تقييم هذه المركبات، وأمثلة أدائها في إعدادات سريرية وتحت سريرية[١٣٩، ٥٧، ٤٣-١٤٣]. تشمل عملية اكتشاف الدواء عدة خطوات، أولها فيما يتعلق بالتعرف، وتقييم الهدف بشكل عام منتج جيني، وظيفته تكون بنمذجة منتجات فارماكولوجية.

قد يكون أمثلة على ذلك مركبات تثبط فعاليات منتجات جينية مسؤولة عن ورم دماغي مبكر بعد سكتة أو تفعيل منتج معيوب لجين طافرة، والتي تسبب مرضاً جينياً. تتضمن الأهداف النموذجية مثبطات الأنزيم ومستقبل لعضلة ناهضة، أو ضادة ومثبطات أو مفعلات نقل. التعرف على الهدف وتقييمه يمكن أن يشمل جينا وتعبيراً روتينياً باستخدام مصفوفات ميكروية[٢١].

في الخطوة الثانية يتم التعرف على أحسن المركبات المرشحة بواسطة إجراء HTPS لمجموعة جزيئية صغيرة متنوعة أو لمركبات مختارة حسب البنية مع فعالية متوقعة إما معروفة أو نظرية. يتم بعد ذلك تقييم المركبات الناجحة في هذا المسح الأولي على أساس معطيات عديدة بما فيها تحليل سمية المركب حركيته (توزع المركب واستقلابه في الأعضاء وسوائل البدن إطراح المركب واصطفائية المركب وتفاعلات دواء- دواء محتملة واحتمال توليد طفرات وسميته مع تناوله لفترة طويلة) وتحريكه (فعالية في الزجاج وفي الكائن الحي)، ولكن لايتم الوقوف عند هذه المعاملات فقط[١٤٤،١٤٥]. تستخدم معايرات المسح الثانوية لتأكيد اصطفائية الهدف. تخضع المركبات المختارة لأمثلة بكيمياء الاصطناع، ولتقييم قبل سريري موسع في نماذج حيوانية[١٤٦- ١٥٠].

ثامناً:مستقبل التقنية النانوية والمسح عالي التدفق

Future of Nanotechnology and HTPS

مع تطبيقات المسح عالي التدفق في المجال السريري، فإن عالم التشخيص والمعالجة سيدخل حقاً مرحلة الطب الشخصي. ستكون شروط المريض من حيث التشخيص والمعالجة والتدبير أسرع وأكثر فعالية، وأبسط وأكثر ثقة مما كان محتملاً قبل، لذا تكون أكثر فائدة للمريض. سيسمح المسح عالي التدفق بتناغم الأدوية لمعالجة مريض واحد بالاعتماد على النمط الجيني الخاص بالمريض.

تقنية وعلم النانو له أدوار مركزية يلعبها في هذه العملية للحصول على نتائج إيجابية فإنه سيكون هناك حاجة إلى فرق بحث من اختصاصات متعددة أكثر وأوسع للتعرف على هذه الثورة المتوقعة. بشكل مغاير لنماذج الزمنية للتعاون الأكاديمي بين المخابر عالية التخصص فإن جهود علم النانو ستحتاج إلى باحثين يتعلمون لغات بعضهم ويشكلون شراكة تتضافر كعناصر مثقفة للحصول على فريق متلاحم. وإلا فإن تعقيد التقنيات النانوية الجديدة سيحد من تطبيقاتها في المجال الطبي الحيوي والسريري.

المراجع

1. MC Roco. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Curr Opin Biotechnol* 14: 337–346, 2003.
2. DF Emerich and CG Thanos. Nanotechnology and medicine. *Expert Opin Biol Th* 3:655–663, 2003.
3. J Letowski, R Brousseau, and L Masson. DNA microarray applications in environmental microbiology. *Anal Lett* 36: 3165–3184, 2003.
4. KS Lam and M Renil. From combinatorial chemistry to chemical microarray. *Curr Opin Chem Biol* 6: 353–358, 2002.
5. J Khandurina and A Guttman. Microchip-based high throughput screening analysis of combinatorial libraries. *Curr Opin Chem Biol* 6: 359–366, 2002.
6. JL West and NJ Halas. Engineered nanomaterials for biophotonics applications: improving sensing, imaging, and therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng* 5: 285–292, 2003.
7. T Vo-Dinh. Nanobiosensors: probing the sanctuary of individual living cells. *J Cell Biochem* 87: 154–161, 2002.
8. C Tilstone. Vital statistics. *Nature* 424: 610–612, 2003.
9. D Michalovich, J Overington, and R Fagan. Protein sequence analysis in silico: application of structure-based bioinformatics to genomic initiatives. *Curr Opin Pharmacol* 2: 574–580, 2002.
10. RJ Carroll. Variances are not always nuisance parameters. *Biometrics* 59: 211–220, 2003.
11. AD Weston and L Hood. Systems biology, proteomics, and the future of health care: toward predictive, preventative, and personalized medicine. *J Proteome Res* 3: 179–196, 2004.
12. G Walter, K Bussow, D Cahill, A Lueking, and H Lehrach. Protein arrays for gene expression and molecular interaction screening. *Curr Opin Microbiol* 3: 298–302, 2000.

13. RA Young. Biomedical discovery with DNA arrays. *Cell* 102: 9–15, 2000.
14. ZP Weng and C DeLisi. Protein therapeutics: promises and challenges for the 21st century. *Trends Biotechnol* 20: 29–35, 2002.
15. ME Chicurel and DD Dalma-Weiszhausz. Microarrays in pharmacogenomics: advances and future promise. *Pharmacogenomics* 3: 589–601, 2002.
16. OE Beske and S Goldbard. High-throughput cell analysis using multiplexed array technologies. *Drug Discov Today* 7: S131–S135, 2002.
17. A Schulze and J Downward. Navigating gene expression using microarrays: a technology review. *Nat Cell Biol* 3: E190–E195, 2001.
18. M Gabig and G Wegrzyn. An introduction to DNA chips: principles, technology, applications and analysis. *Acta Biochim Pol* 48: 615–622, 2001.
19. M Arcellana-Panlilio and SM Robbins. Cutting-edge technology. I. Global gene expression profiling using DNA microarrays. *Am J Physiol Gastr* 282: G397–G402, 2002.
20. MJ Heller. DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annu Rev Biomed Eng* 4: 129–153, 2002.
21. CM Roth and ML Yarmush. Nucleic acid biotechnology. *Annu Rev Biomed Eng* 1: 265–297, 1999.
22. WM Freeman, DJ Robertson, and KE Vrana. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *Biotechniques* 29: 1042–1045, 2000.
23. JD Pollock. Gene expression profiling: methodological challenges, results, and prospects for addiction research. *Chem Phys Lipids* 121: 241–256, 2002.
24. F Gros. From the messenger RNA saga to the transcriptome era. *Cr Biol* 326: 893–900, 2003.
25. H Zhu and M Snyder. "Omic" approaches for unraveling signaling networks. *Curr Opin Cell Biol* 14: 173–179, 2002.
26. DD Shoemaker and PS Linsley. Recent developments in DNA microarrays. *Curr Opin Microbiol* 5: 334–337, 2002.
27. HP Saluz, J Iqbal, GV Limmon, A Ruryk, and ZH Wu. Fundamentals of DNA chip/array technology for comparative gene expression analysis. *Curr Sci India* 83: 829–833, 2002.
28. L Smith and A Greenfield. DNA microarrays and development. *Hum Mol Genet* 12: R1–R8, 2003.
29. CM Ding and CR Cantor. Quantitative analysis of nucleic acids: the last few years of progress. *J Biochem Mol Biol* 37: 1–10, 2004.
30. D Vetter. Chemical microarrays, fragment diversity, label-free imaging by Plasmon resonance: a chemical genomics approach. *J Cell Biochem* 87: 79–84, 2002.
31. BJ Battersby and M Trau. Novel miniaturized systems in high-throughput screening. *Trends Biotechnol* 20: 167–173, 2002.
32. A Bauer, B Beckmann, C Busold, O Brandt, W Kusnezow, J Pullat, V Aign, K Fellenberg, R Fleischer, A Jacob, M Frohme, and JD Hoheisel. Use of

complex DNA and antibody microarrays as tools in functional analyses. *Comp Funct Genom* 4: 520–524, 2003.
33. MC Pirrung. How to make a DNA chip. *Angew Chem Int Edit* 41: 1277, 2002.
34. DV Nguyen, AB Arpat, NY Wang, and RJ Carroll. DNA microarray experiments: biological and technological aspects. *Biometrics* 58: 701–717, 2002.
35. M Glazer, J Fidanza, G McGall, and C Frank. Colloidal silica films for high-capacity DNA probe arrays. *Chem Mater* 13: 4773–4782, 2001.
36. MJ Buck and JD Lieb. ChIP chip: considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments. *Genomics* 83: 349–360, 2004.
37. L Joos, E Eryuksel, and MH Brutsche. Functional genomics and gene microarrays: use in research and clinical medicine. *Swiss Med Wkly* 133: 31–38, 2003.
38. FL Kiechle and XB Zhang. The postgenomic era: implications for the clinical laboratory. *Arch Pathol Lab Med* 126: 255–262, 2002.
39. FL Kiechle and CA Holland-Staley. Genomics, transcriptomics, proteomics, and numbers. *Arch Pathol Lab Med* 127: 1089–1097, 2003.
40. RC McGlennen. Miniaturization technologies for molecular diagnostics. *Clin Chem* 47: 393–402, 2001.
41. P Cutler. Protein arrays: current state of the art. *Proteomics* 3: 3–18, 2003.
42. MF Templin, D Stoll, JM Schwenk, O Potz, S Kramer, and TO Joos. Protein microarrays: promising tools for proteomic research. *Proteomics* 3: 2155–2166, 2003.
43. C Huels, S Muellner, HE Meyer, and DJ Cahill. The impact of protein biochips and microarrays on the drug development process. *Drug Discov Today* 7: S119–S124,
2002.
44. JM Nam, SW Han, KB Lee, XG Liu, MA Ratner, and CA Mirkin. Bioactive protein nanoarrays on nickel oxide surfaces formed by dip-pen nanolithography. *Angew Chem Int Edit* 43: 1246–1249, 2004.
45. KB Lee, SJ Park, CA Mirkin, JC Smith, and M Mrksich. Protein nanoarrays generated by dip-pen nanolithography. *Science* 295: 1702–1705, 2002.
46. G Walter, K Bussow, A Lueking, and J Glokler. High-throughput protein arrays: prospects for molecular diagnostics. *Trends Mol Med* 8: 250–253, 2002.
47. XL Gao, XC Zhou, and E Gulari. Light directed massively parallel on-chip synthesis of peptide arrays with t-Boc chemistry. *Proteomics* 3: 2135–2141, 2003.
48. R Frank. The SPOT synthesis technique: synthetic peptide arrays on membrane supports: principles and applications. *J Immunol Methods* 267: 13–26, 2002.
49. YS Lee and M Mrksich. Protein chips: from concept to practice. *Trends Biotechnol* 20: S14–S18, 2002.

50. Y Fang, J Lahiri, and L Picard. G protein-coupled receptor microarrays for drug discovery. *Drug Discov Today* 8: 755–761, 2003.
51. SP Lal, RI Christopherson, and CG dos Remedios. Antibody arrays: an embryonic but rapidly growing technology. *Drug Discov Today* 7: S143–S149, 2002.
52. G Elia, M Silacci, S Scheurer, J Scheuermann, and D Neri. Affinity-capture reagents for protein arrays. *Trends Biotechnol* 20: S19–S22, 2002.
53. DN Wang. Carbohydrate microarrays. *Proteomics* 3: 2167–2175, 2003.
54. KR Love and PH Seeberger. Carbohydrate arrays as tools for glycomics. *Angew Chem Int Edit* 41: 3583–3586, 2002.
55. J Hirabayashi. Oligosaccharide microarrays for glycomics. *Trends Biotechnol* 21: 141–143, 2003.
56. PA Johnston. Cellular platforms for HTS: three case studies. *Drug Discov Today* 7: 353–363, 2002.
57. SN Bailey, RZ Wu, and DM Sabatini. Applications of transfected cell microarrays in high-throughput drug discovery. *Drug Discov Today* 7: S113–S118, 2002.
58. G Sauter, R Simon, and K Hillan. Tissue microarrays in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2: 962–972, 2003.
59. DL Rimm, RL Camp, LA Charette, J Costa, DA Olsen, and M Reiss. Tissue microarray: new technology for amplification of tissue resources. *Cancer J* 7: 24–31, 2001.
60. H Moch, J Kononen, OP Kallioniemi, and G Sauter. Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? *Adv Anat Pathol* 8: 14–20, 2001.
61. JR Epstein, APK Leung, KH Lee, and DR Walt. High-density, microsphere-based fiber optic DNA microarrays. *Biosens Bioelectron* 18: 541–546, 2003.
62. JR Epstein and DR Walt. Fluorescence-based fibre optic arrays: a universal platform for sensing. *Chem Soc Rev* 32: 203–214, 2003.
63. DR Walt. Molecular biology: bead-based fiber-optic arrays. *Science* 287: 451–452, 2000.
64. AD Sheehan, J Quinn, S Daly, P Dillon, and R O'Kennedy. The development of novel miniaturized immuno-sensing devices: review of a small technology with a large future. *Anal Lett* 36: 511–537, 2003.
65. SJ Lee and SY Lee. Micro total analysis system (mu-TAS) in biotechnology. *Appl Microbiol Biot* 64: 289–299, 2004.
66. J Khandurina and A Guttman. Bioanalysis in microfluidic devices. *J Chromatogr A* 943: 159–183, 2002.
67. J Khandurina and A Guttman. Microscale separation and analysis. *Curr Opin Chem Biol* 7: 595–602, 2003.
68. LJ Kricka and P Wilding. Microchip PCR. *Anal Bioanal Chem* 377: 820–825, 2003.

69. P Gascoyne, J Satayavivad, and M Ruchirawat. Microfluidic approaches to malaria detection. *Acta Trop* 89: 357–369, 2004.
70. TH Park and ML Shuler. Integration of cell culture and microfabrication technology. *Biotechnol Progr* 19: 243–253, 2003.
71. JK Jaiswal, H Mattoussi, JM Mauro, and SM Simon. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nat Biotechnol* 21: 47–51, 2003.
72. LA Bottomley. Scanning probe microscopy. *Anal Chem* 70: 425–475, 1998.
73. P Dutta, CA Tipple, NV Lavrik, PG Datskos, H Hofstetter, O Hofstetter, and MJ Sepaniak. Enantioselective sensors based on antibody-mediated nanomechanics. *Anal Chem* 75: 2342–2348, 2003.
74. JH Pei, F Tian, and T Thundat. Glucose biosensor based on the microcantilever. *Anal Chem* 76: 292–297, 2004.
75. M Su, SU Li, and VP Dravid. Microcantilever resonance-based DNA detection with nanoparticle probes. *Appl Phys Lett* 82: 3562–3564, 2003.
76. B Daviss. A springboard to easier bioassays. *Scientist* 18: 40–44, 2004.
77. J Tamames, D Clark, J Herrero, J Dopazo, C Blaschke, JM Fernandez, JC Oliveros, and A Valencia. Bioinformatics methods for the analysis of expression arrays: data clustering and information extraction. *J Biotechnol* 98: 269–283, 2002.
78. TG Dewey. From microarrays to networks: mining expression time series. *Drug Discov Today* 7: S170–S175, 2002.
79. M Carella, S Volinia, and P Gasparini. Nanotechnologies and microchips in genetic diseases. *J Nephrol* 16: 597–602, 2003.
80. PA Clarke, RT Poele, R Wooster, and P Workman. Gene expression microarray analysis in cancer biology, pharmacology, and drug development: progress and potential. *Biochem Pharmacol* 62: 1311–1336, 2001.
81. V Reinke and KP White. Developmental genomic approaches in model organisms. *Annu Rev Genom Hum* G 3: 153–178, 2002.
82. G Colebatch, B Trevaskis, and M Udvardi. Functional genomics: tools of the trade. *New Phytol* 153: 27–36, 2002.
83. RO Elferink. One step further toward real high-throughput functional genomics. *Trends Biotechnol* 21: 146–147, 2003.
84. F Michiels, H van Es, and P Tomme. One step further toward real high throughput functional genomics. *Trends Biotechnol* 21: 147–148, 2003.
85. S Steer and AJ MacGregor. Genetic epidemiology: disease susceptibility and severity. *Curr Opin Rheumatol* 15: 116–121, 2003.
86. K Susztak, K Sharma, M Schiffer, P McCue, E Ciccone, and EP Bottinger. Genomic strategies for diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14: S271–S278, 2003.
87. P Devarajan, J Mishra, S Supavekin, LT Patterson, and SS Potter. Gene expression in early ischemic renal injury: clues toward pathogenesis, biomarker discovery, and novel therapeutics. *Mol Genet Metab* 80: 365–376, 2003.

88. PS Hayden, A El-Meanawy, JR Schelling, and JR Sedor. DNA expression analysis: serial analysis of gene expression, microarrays and kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hy* 12: 407–414, 2003.
89. EP Bottinger, WJ Ju, and J Zavadil. Applications for microarrays in renal biology and medicine. *Exp Nephrol* 10: 93–101, 2002.
90. NA Shackel, MD Gorrell, and GW McCaughan. Gene array analysis and the liver. *Hepatology* 36: 1313–1325, 2002.
91. F Eertmans, W Dhooge, S Stuyvaert, and F Comhaire. Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment. *Toxicol in Vitro* 17: 515–524, 2003.
92. KD Hirschi, JA Kreps, and KK Hirschi. Molecular approaches to studying nutrient metabolism and function: an array of possibilities. *J Nutr* 131: 1605s–1609s, 2001.
93. GP Page, JW Edwards, S Barnes, R Weindruch, and DB Allison. A design and statistical perspective on microarray gene expression studies in nutrition: the need for playful creativity and scientific hard-mindedness. *Nutrition* 19: 997–1000, 2003.
94. E Bernal-Mizrachi, C Cras-Meneur, M Ohsugi, and MA Permutt. Gene expression profiling in islet biology and diabetes research. *Diabetes Metab Res* 19: 32–42, 2003.
95. S Welle. Gene transcript profiling in aging research. *Exp Gerontol* 37: 583–590, 2002.
96. SA Cook and A Rosenzweig. DNA microarrays: implications for cardiovascular medicine. *Circ Res* 91: 559–564, 2002.
97. WP Kuo, ME Whipple, ST Sonis, L Ohno-Machado, and TK Jenssen. Gene expression profiling by DNA microarrays and its application to dental research. *Oral Oncol* 38: 650–656, 2002.
98. WP Kuo, ME Whipple, TK Jenssen, R Todd, JB Epstein, L Ohno-Machado, ST Sonis, and PJ Park. Microarrays and clinical dentistry. *J Am Dent Assoc* 134: 456–462, 2003.
99. ME Whipple and WP Kuo. DNA microarrays in otolaryngology: head and neck surgery. *Otolaryng Head Neck* 127: 196–204, 2002.
100. EP Hoffman, KJ Brown, and E Eccleston. New molecular research technologies in the study of muscle disease. *Curr Opin Rheumatol* 15: 698–707, 2003.
101. JN Haslett and LM Kunkel. Microarray analysis of normal and dystrophic skeletal muscle. *Int J Dev Neurosci* 20: 359–365, 2002.
102. AY Gracey and AR Cossins. Application of microarray technology in environmental and comparative physiology. *Annu Rev Physiol* 65: 231–259, 2003.
103. B van Steensel and S Henikoff. Epigenomic profiling using microarrays. *Biotechniques* 35: 346, 2003.
104. Z Luo and DH Geschwind. Microarray applications in neuroscience. *Neurobiol Dis* 8: 183–193, 2001.

105. TJ Sendera, D Dorris, R Ramakrishnan, A Nguyen, D Trakas, and A Mazumder.Expression profiling with oligonucleotide arrays: technologies and applications for neurobiology. *Neurochem Res* 27: 1005–1026, 2002.
106. SJ Watson, F Meng, RC Thompson, and H Akil. The "chip" as a specific genetic tool. *Biol Psychiatr* 48: 1147–1156, 2000.
107. TA Prolla. DNA microarray analysis of the aging brain. *Chem Senses* 27: 299–306, 2002.
108. FM Bareyre and ME Schwab. Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays. *Trends Neurosci* 26: 555–563, 2003.
109. KE Vrana, WM Freeman, and M Aschner. Use of microarray technologies in toxicology research. *Neurotoxicology* 24: 321–332, 2003.
110. ER Marcotte, LK Srivastava, and R Quirion. cDNA microarray and proteomic approaches in the study of brain diseases: focus on schizophrenia and Alzheimer's disease. *Pharmacol Therap* 100: 63–74, 2003.
111. JC Weeks. Thinking globally, acting locally: steroid hormone regulation of the dendritic architecture, synaptic connectivity and death of an individual neuron. *Progr Neurobiol* 70: 421–442, 2003.
112. WE Bunney, BG Bunney, MP Vawter, H Tomita, J Li, SJ Evans, PV Choudary, RM Myers, EG Jones, SJ Watson, and H Akil. Microarray technology: a review of new strategies to discover candidate vulnerability genes in psychiatric disorders. *Am J Psychiatr* 160: 657–666, 2003.
113. DG Albertson. Profiling breast cancer by array CGH. *Breast Cancer Res Tr* 78: 289–298, 2003.
114. S Mohr, GD Leikauf, G Keith, and BH Rihn. Microarrays as cancer keys: an array of possibilities. *J Clin Oncol* 20: 3165–3175, 2002.
115. S Ramaswamy and TR Golub. DNA microarrays in clinical oncology. *J Clin Oncol* 20: 1932–1941, 2002.
116. JK Nagpal and BR Das. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. *Oral Oncol* 39: 213–221, 2003.
117. CA Bandera, B Ye, and SC Mok. New technologies for the identification of markers for early detection of ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gyn* 15: 51–55, 2003.
118. I Haviv and IG Campbell. DNA microarrays for assessing ovarian cancer gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 191: 121–126, 2002.
119. W Wu, W Hu, and JJ Kavanagh. Proteomics in cancer research. *Int J Gynecol Cancer* 12: 409–423, 2002.
120. F Bertucci, P Viens, P Hingamp, V Nasser, R Houlgatte, and D Birnbaum. Breast cancer revisited using DNA array-based gene expression profiling. *Int J Cancer* 103: 565–571, 2003.

121. TR Golub. Genomic approaches to the pathogenesis of hematologic malignancy. *Curr Opin Hematol* 8: 252–261, 2001.
122. C Schwaenen, S Wessendorf, HA Kestler, H Dohner, P Lichter, and M Bentz. DNA microarray analysis in malignant lymphomas. *Ann Hematol* 82: 323–332, 2003.
123. M van de Rijn and CB Gilks. Applications of microarrays to histopathology. *Histopathology* 44: 97–108, 2004.
124. AE Frolov, AK Godwin, and OO Favorova. Differential gene expression analysis by DNA microarray technology and its application in molecular oncology. *Mol Biol* 37: 486–494, 2003.
125. JKC Chan. The new World Health Organization classification of lymphomas: the past, the present and the future (reprinted from *Int. Med* 86, 434–443, 2000). *Hematol Oncol* 19: 129–150, 2001.
126. JE Celis and P Gromov. Proteomics in translational cancer research: toward an integrated approach. *Cancer Cell* 3: 9–15, 2003.
127. BB Haab. Methods and applications of antibody microarrays in cancer research. *Proteomics* 3: 2116–2122, 2003.
128. DD Dalma-Weiszhausz, ME Chicurel, and TR Gingeras. Microarrays and genetic epidemiology: a multipurpose tool for a multifaceted field. *Genet Epidemiol* 23: 4–20, 2002.
129. A Boussioutas and I Haviv. Current and potential uses for DNA microarrays in transplantation medicine: lessons from other disciplines. *Tissue Antigens* 62: 93–103, 2003.
130. P Kellam. Post-genomic virology: the impact of bioinformatics, microarrays and proteomics on investigating host and pathogen interactions. *Rev Med Virol* 11: 313–329, 2001.
131. JP Clewley. A role for arrays in clinical virology: fact or fiction? *J Clin Virol* 29: 2–12, 2004.
132. PA Bryant, D Venter, R Robins-Browne, and N Curtis. Chips with everything: DNA microarrays in infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 4: 100–111, 2004.
133. D Ivnitski, DJ O'Neil, A Gattuso, R Schlicht, M Calidonna, and R Fisher. Nucleic acid approaches for detection and identification of biological warfare and infectious disease agents. *Biotechniques* 35: 862–869, 2003.
134. FX Berthet, T Coche, and C Vinals. Applied genome research in the field of human vaccines. *J Biotechnol* 85: 213–226, 2001.
135. JC Boothroyd, I Blader, M Cleary, and U Singh. DNA microarrays in parasitology: strengths and limitations. *Trends Parasitol* 19: 470–476, 2003.
136. PK Rathod, K Ganesan, RE Hayward, Z Bozdech, and JL DeRisi. DNA microarrays for malaria. *Trends Parasitol* 18: 39–45, 2002.
137. GK Schoolnik. Functional and comparative genomics of pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* 5: 20–26, 2002.

138. M Kato-Maeda, Q Gao, and PM Small. Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts. *Cell Microbiol* 3: 713–719, 2001.
139. DN Howbrook, AM van der Valk, MC O'Shaughnessy, DK Sarker, SC Baker, and AW Lloyd. Developments in microarray technologies. *Drug Discov Today* 8: 642–651, 2003.
140. D Brunner, E Nestler, and E Leahy. In need of high throughput behavioral systems. *Drug Discov Today* 7: S107–S112, 2002.
141. TW Gant. Application of toxicogenomics in drug development. *Drug News Perspect* 16: 217–221, 2003.
142. AS Verkman. Drug discovery in academia. *Am J Physiol Cell Ph* 286: C465–C474, 2004.
143. EH Ohlstein, RR Ruffolo, and JD Elliott. Drug discovery in the next millennium. *Annu Rev Pharmacol* 40: 177–191, 2000.
144. KV Chin and ANT Kong. Application of DNA Microarrays in pharmacogenomics and toxicogenomics. *Pharmaceut Res* 19: 1773–1778, 2002.
145. G Orphanides. Toxicogenomics: challenges and opportunities. *Toxicol Lett* 140: 145–148, 2003.
146. H Loferer. Mining bacterial genomes for antimicrobial targets. *Mol Med Today* 6: 470–474, 2000.
147. M Basik, S Mousses, and J Trent. Integration of genomic technologies for accelerated cancer drug development. *Biotechniques* 35: 580, 2003.
148. KD Kumble. Protein microarrays: new tools for pharmaceutical development. *Anal Bioanal Chem* 377: 812–819, 2003.
149. TW Snell, SE Brogdon, and MB Morgan. Gene expression profiling in ecotoxicology. *Ecotoxicology* 12: 475–483, 2003.
150. JI Glass, AE Belanger, and GT Robertson. *Streptococcus pneumoniae* as a genomics platform for broad-spectrum antibiotic discovery. *Curr Opin Microbiol* 5: 338–342, 2002.