

BÖLÜM 7

BİYOSENSÖRLER VE BİYOKİMYA ALANINDAKİ UYGULAMALARI

Gökay VARDAR¹
Ferhat HANİKOĞLU²

BİYOSENSÖRLERİN TANIMI

Bir biyosensör genellikle biyolojik bir yanıtı veya olayı ölçülebilir bir yanıtı dönüştüren analitik bir cihaz olarak tanımlanır. Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC)'ye göre biyosensörler kimyasal bir maddeye verilen biyolojik cevabı optik, termal veya elektrik sinyallerine dönüştüren elektrokimyasal cihazlardır. Biyoteknoloji ve elektroniğin sinerjik kombinasyonu, biyosensör teknolojisi adı verilen bir teknoloji nesline yol açmıştır (1).

Biyosensörler, modern analitik kimyanın çeşitli alanlarında önemli olan analitik araçlar grubunu oluşturur. Neredeyse tüm biyoetkileşim türleri ve analit tanıma şemalarına uygulanabilir. Bu şemalarda küçük biyomoleküller, enzimler, antikorlar, nükleik asitler ve ayrıca virüsler, hücreler ve mikroorganizmalar yer alabilir. Ayrıca, biyosensörlerin klinik ve biyomedikal uygulamaları, çevre, gıda ve ilaç analizleri gibi diğer önemli alanlar da biyosensörlerin kullanım alanına girmektedir. (2).

BİYOSENSÖRLERİN TARİHÇESİ

Biyosensör çalışmaları 20. yüz yılın başlarında pek yapılmamaktaydı (3). 1956 senesinde Clark kandaki oksijen düzeyini oksijen elektrodu ile ölçerek biyosensörlerin babası ismini almıştır. Daha sonra biyosensörlerin öncüleri olan Clark ve Lyons 1962 senesinde glukoz oksidaz enzimini oksijen elektrodu yüzeyindeki diyaliz membran içinde tutarak kan glukoz düzeyini ölçen glukoz biyosensörü tasarlamışlardır (4). Daha sonra 1967'de Updike ve Hicks, glukozun hızlı ve kantitatif tayini için glukoz oksidaz enziminin bir oksijen elektrodunun yüzeyine bir

¹ Dr. Öğr. Üyesi, İstanbul Sağlık ve Teknoloji Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, gokay.vardar@istun.edu.tr

² Dr. Öğr. Üyesi, Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD. ferhat.hanikoglu@alanya.edu.tr

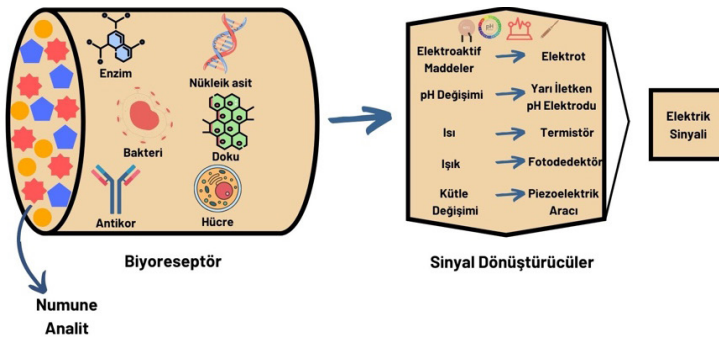
poliakrilamid jel içinde immobilize edildiği benzer bir cihazı tanımlamak için “enzim elektrodu” terimini kullanmışlardır. Guilbault ve Montalvo 1969’da potansiyometrik ölçüm ile üre konsantrasyonunu ölçmek için üreaz ile birleştirilmiş cam elektrotlar kullanarak ilk potansiyometrik biyosensörü meydana getirmişlerdir. Clark’ın çalışması ve ardından teknolojisinin Yellow Spring Instrument Company’ye transferi, 1975’de ilk özel glikoz biyosensörünün ticari olarak başarılı bir şekilde piyasaya sürülmesine yol açmıştır (5).

1970’lerde iyon seçici elektrotlar (ISE) üzerine araştırmalar çok aktifti. Profesör G. Rechnitz, benzaldehit ve siyanür vermek üzere bir İyon Seçici Elektrot (siyanür ISE) ile beta glukozidazın bağlanmasına dayanan bir “amigdalin” sensörü geliştirdi. Buna ek olarak, termal dönüştürücülere dayalı biyosensör uygulamaların popülerliği artış gösterdi. Bu buluşu, immobilize bir indikatör ile CO₂ veya O₂’yi tespit etmek için Lubberz ve Optiz tarafından optik biyosensörün geliştirilmesi izledi. 1970’lerde potansiyometrik teknikler biyosensör alanında ivme kazandı. Ayrıca bu dönemde antikorların elektroda piezoelektrik ve potansiyometrik dönüştürücü ile sabitlenmesiyle amperometrik algılamaya dayalı bir immünosensör geliştirildi (6,7).

BİYOSENSÖRLERİN YAPISI VE FONKSİYONU

Biyosensörler, Şekil 1’de görüldüğü gibi spesifik olarak analite bağlanan biyokomponentler (biyoreseptör) ve biyoreseptörün analit ile etkileştiğinde ortaya çıkan fiziksel ya da kimyasal sinyali elektriksel sinyale dönüştüren fiziksel komponentlerden (transduser) oluşur.

Analit ile biyoreseptör etkileştiğinde ortaya çıkan sinyal proton konsantrasyonundaki değişimden, amonyak ya da oksijen gibi gazların salınmasından, ışık veya ısı emisyonu, kütle değişimi, absorpsiyon gibi değişimlerden kaynaklanır (3).



Şekil 1. Biyosensörlerin Genel Yapısı

Biyosensörlerin oluşturulmasında biyoreseptör ve transduser seçimi ve bunların kombinasyonu çok önemlidir. Bu yüzden teorik olarak reseptör ve transduserlerin kombinasyonu mümkün olmasına rağmen, bu kombinasyon bir elektriksel sinyal oluşturamazsa biyosensör fonksiyon göstermez (8).

Bir hedef analit belirlendikten sonra, başarılı bir biyosensör geliştirmek için aşağıdaki koşulların olması gerekmektedir.

1. Uygun bir biyoreseptör veya bir tanıma molekülünün seçimi önemlidir. Biyoreseptör, analizin amacı için oldukça spesifik olmalı, normal saklama koşulları altında stabil olmalı ve testler arasında düşük varyasyon göstermelidir.
2. Uygun bir immobilizasyon yönteminin seçilmesi gerekmektedir. Ayrıca reaksiyon, karıştırma, pH ve sıcaklık gibi fiziksel parametrelerden yönetilebilir düzeyde bağımsız olmalıdır.
3. Bağlanma reaksiyonunu ölçülebilir sinyale çeviren bir dönüştürücünün seçimi ve tasarımına dikkat edilmelidir.
4. Yanıt, seyreltme veya konsantrasyon olmaksızın, ilgili konsantrasyon aralığında doğru, kesin, tekrarlanabilir ve doğrusal olmalıdır. Ayrıca elektriksel veya diğer dönüştürücü kaynaklı gürültülerden arındırılmış olmalıdır.
5. Biyosensör klinik durumlarda invaziv izleme için kullanılacaksa, prob küçük ve biyouyumlu olmalı, toksik veya antijenik etkileri olmamalıdır. Ayrıca, biyosensör inaktivasyona veya proteolize eğilimli olmamalıdır.
6. İnsan numunelerinden alınan analitlerin hızlı ölçümleri için biyosensörün gerçek zamanlı analiz sağlaması arzu edilir.

Komple biyosensör ucuz, küçük, taşınabilir ve yarı vasıflı operatörler tarafından kullanılacak nitelikte olmalıdır (5,9).

Biyoreseptörler (Biyokomponentler)

Biyosensörlerin yapısında bulunun biyoreseptörler, analite karşı yüksek afinite, özgüllük gösteren ve analit ile seçici olarak etkileşime giren biyomoleküllerdir.

Enzimler, hücreler, virüsler, mikroorganizmalar, dokular, reseptörler, nükleik asitler ve antikolar biyosensörün biyolojik bileşenini oluşturur. Enzimler oldukça spesifiktir, bu nedenle biyosensörlerde enzimlerin yer aldığı kapsamlı uygulamalar bulunmaktadır. Sensörlerde kullanılmak üzere kullanılan enzimlerin çoğu mikroorganizmalardan izole edildiğinden, organizmaların kendilerinin potansiyel biyokatalizörler olarak kabul edilmesi mantıklıdır. Antikor ve antijen etkileşimleri, biyosensör yapımında kullanılan hücre zarları ve organellerinin yanı sıra immünosensörlerde de kullanılmıştır (10,11).

Fiziksel Komponentler (Transduserler)

Bir biyosensörün anahtar parçası, reaksiyona eşlik eden fizikokimyasal değişimden yararlanan dönüştürücülerdir. Transduserler, reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler ve biyokimyasal reaksiyona göre transduser seçilir. Biyosensörlerin geliştirilmesinde çeşitli dönüştürücü türleri kullanılmıştır (1,8). Biyosensörlerde kullanılan dört ana dönüştürücü türü elektrokimyasal, optik, piezoelektrik ve termal dönüştürücülerdir. Elektrokemilüminesans cihazları, uyarma elektrik enerjisi gerektirdiğinde bile, genellikle optik olarak kabul edilir (11).

BİYOSENSÖRLERİN SINIFLANDIRILMASI

Biyoreseptörler, biyosensör yapımında birincil bileşen olarak kabul edilir. Biyoreseptöre göre biyosensörler, enzimatik biyosensörler (en yaygın biyosensör sınıfı), immünosensörler (yüksek özgüllüğe ve duyarlılığa sahiptir ve özellikle tanıda faydalıdır), aptamer veya nükleik asit bazlı biyosensörler (mikrobiyal türler ve nükleik asitler için yüksek özgüllüğe sahiptir) olarak ve mikrobiyal veya tam hücreli biyosensörlerdir. İkinci sınıflandırma dönüştürücü bazında yapılırlar ve sensörler elektrokimyasal (potansiyometrik, amperometrik, empedans ve kondüktometrik olarak gruplandırılır), elektronik biyosensör, termal biyosensör, optik ve kütle tabanlı veya gravimetrik olarak sınıflandırılır.

Başka bir sınıflandırma, sınırlı olan biyoreseptör-analit kombinasyonlarını içerir. Algılama sistemine bağlı olarak bazı sınıflandırmalar yapılmaktadır. (Optik, elektrik, elektronik, termal, mekanik ve manyetik) ve teknolojiye bağlı olarak (nano, yüzey plazmon rezonansı (SPR), çip üzerinde biyosensörler (lab-on-chip), elektrometreler) (12).

Biyoreseptörlere Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyotanıma ilkesine göre, biyosensörler katalitik biyosensörler ve afinite veya katalitik olmayan biyosensörler olarak sınıflandırılır. Katalitik bir biyosensörde, analit-biyoreseptör etkileşimi, yeni bir biyokimyasal reaksiyon ürününün ortaya çıkmasıyla sonuçlanır. Bu biyosensör enzimleri, mikroorganizmaları, dokuları ve tüm hücreleri içerir. Afinite (katalitik olmayan) biyosensör durumunda, analit reseptöre geri dönüşümsüz olarak bağlanır ve etkileşim sırasında yeni biyokimyasal reaksiyon ürünü oluşmaz. Bu sensör tipi, tespit için hedef olarak antikolları, hücre reseptörlerini ve nükleik asitleri içerir (12,13).

Enzim Bazlı Biyosensörler

Enzim bazlı kimyasal biyosensörler biyolojik tanıma dayalıdır. Çalışmak için, enzimlerin belirli bir biyokimyasal reaksiyonu katalize edecek şekilde mevcut olması ve biyosensörün normal çalışma koşulları altında stabil olması gerekir (14). Bir biyosensörde, enzim aktivitesini sürdürmek için dönüştürücü yüzeyindeki destek matriksi üzerinde/içinde hareketsiz hale getirilir.

Enzim-substrat etkileşimlerinin yüksek özgüllüğü ve biyokatalizörlerin yüksek devir hızları (yani, katalizör aktivitesinin ve yaşam süresinin ürünü) gibi enzim kullanmanın avantajları, enzim bazlı biyosensörleri en kapsamlı çalışılan alanlardan biri haline getirmiştir. Bununla birlikte, enzim yapısı son derece hassastır, bu da duyarlılığını, kararlılığını ve uyarlanabilirliğini geliştirmeyi pahalı ve karmaşık hale getirir (12). Enzim bazlı biyosensörün algılama prensibi, proton konsantrasyonu (H^+), gazların salınımı veya alımı (yani, CO_2 , NH_3 , O_2 , vb.), ışık emisyonu gibi değişiklikleri ölçerek belirli analitlerin varlığını tespit etmektir. Uygun dönüştürücü daha sonra bu değişiklikleri ilgili analitleri tanımlamak için kullanılan ölçülebilir sinyallere (elektriksel, optik veya termal sinyaller) dönüştürür (15).

Antikor Bazlı Biyosensörler

Antikorlar veya immüno globulinler, konağın antijene karşı immün yanıtı olarak B-hücreleri tarafından üretilen Y-şekilli proteinlerdir. Ligand olarak gömülü bir antikora sahip olan veya antikor-antijen etkileşimi üzerinde işlev gören biyosensörlere immünosensörler denir. Biyosensör uygulaması için, hedefe karşı spesifik bir antikor tepkisi elde etmek için uygun bir konakçı adjuvan da kullanılarak ilgili antijen ile immünize edilir. Prob olarak kullanılan antikorlar poliklonal, monoklonal veya rekombinant olabilir (16). İmmünosensörler (i) etiketsiz ve (ii) etiketli olarak sınıflandırılır. Etiketlenmemiş immünosensörler, kompleksin gelişiminin neden olduğu fiziksel değişiklikleri tahmin ederek antijen-antikor kompleksini spesifik olarak belirlemek için oluşturulur. Etiketli immünosensör durumunda, hassas olarak saptanabilir bir etiket (işaretleyici) eklenir. Antijen-antikor kompleksi, etiket ölçümü ile hassas bir şekilde değerlendirilir (12).

Aptamer Bazlı Biyosensörler

Aptamerler, hedef moleküllere seçici olarak bağlanan ve iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) yapıya katlanabilen sentetik tek sarmallı nükleik asitlerdir (DNA veya RNA dizileri). Aptamerlerin en önemli özelliği, hedef molekül için saptama kriterlerine göre kimyasal olarak modifiye edilebilmeleridir. Aptamerler, teşhis ve tedavi için giderek daha önemli moleküler araçlar haline gelmiştir. Bu sebeple son

yıllarda aptamer tabanlı sensörler (aptasensörler) özellikle dikkat çekmektedir. Aptamer bazlı biyosensörler, antikor bazlı sensörlere göre yeniden kullanılabilirlik avantajı sunar. Ayrıca, küçük boyutları ve çok yönlülüğü nedeniyle minyatür sistemlerde kullanılabilir. Optik, elektrokimyasal ve piezoelektrik teknikler aptamer bazlı biyosensörlerde en sık kullanılanlardır. Farklı transdüksiyon tekniklerine bağlı olarak, bu biyosensörler ayrıca etiketli veya etiketsiz aptasensörler olarak kategorize edilir. Yüzey plazmon rezonansı (SPR), etiketsiz optik sensörler için en yaygın kullanılan yöntemdir, oysa etiket tabanlı optik aptasensörler için floresan boyalar (floresan) kullanılır (12, 17).

Tam Hücre Bazlı Biyosensörler

Tam hücre bazlı biyosensörler, potansiyel biyotanıma elemanı olarak mikropları (bakteri, mantar (mayalar ve küfler), algler, protozoa ve virüsler) kullanırlar. Bu biyosensörler ayrıca bir numunenin farmakolojisi, hücre fizyolojisi, toksikolojisi ile ilgili bilgiler gibi molekül tabanlı biyosensörlerin veremediği bilgileri de sağlayabilir. Tipik bir tam hücre tabanlı biyosensörün temel mekanizması, belirli bir analit türünün tespiti ve bu tanımlamanın bir işlemci aracılığıyla bir elektriksel ve optik sinyale yükseltilmesidir. Bu okuma işlemi, moleküler tanıma elemanlarını sağlayan birim olarak canlı hücrelerin veya bakterilerin hareketsizleştirilmesi ve kullanılması yoluyla saptanabilir. Geleneksel bir biyosensörden farklı olarak, tam hücre tabanlı biyosensörler daha geniş bir madde yelpazesini algılayabilir ve bu nedenle bir doku örneğinin, diğer hücrelerin veya çevrenin elektrokimyasal durumdaki değişikliklere karşı daha hassastır, çünkü bunlar genetik modifikasyona sahiptir ve çeşitli sıcaklık ve pH değerleri gibi daha geniş bir koşullar aralığında çalışabilirler (12,18).

Dönüştürücülere Göre Biyosensörler

Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, enzim-substrat reaksiyonu ve antijen-antikor etkileşimi gibi biyokimyasal olayları elektrik sinyallerine (örn. akım, voltaj, empedans vb.) dönüştüren analitik cihazlardır (19).

Yüksek hassasiyet, daha düşük tespit limitleri, otomasyon, düşük test maliyetleri ve çok küçük numune hacimleriyle çalışabilen tek kullanımlık cihazların ve metodolojilerin geliştirilmesi, elektrokimyasal biyosensörlerle ilişkili avantajlardan bazılarıdır (20).

Biyosensörleri karakterize etmek veya biyotanıma olayları sırasında cevap sinyallerini ölçmek için çok çeşitli elektrokimyasal teknikler kullanılabilir (21).

Bu nedenle elektrokimyasal biyosensörler voltametrik, konduktometrik, empedimetrik, amperometrik ve potansiyometrik olarak sınıflandırılabilir (20).

a) Potansiyometrik Biyosensörler: Potansiyometrik biyosensör, bir elektrokimyasal potansiyel dönüştürücüye bağlı biyolojik algılama elemanı içeren bir cihaz olarak tanımlanabilir. Potansiyometrik biyosensörler genellikle daha basit bir kimyasal türe ve ardından elektrokimyasal algılamaya (NH_4OH , CO_2 , pH, H_2O_2 ...) yol açan biyokimyasal reaksiyonlara dayanır. Potansiyometrik biyosensör tarafından üretilen analitik sinyal, bir elektrik potansiyelidir (22). Potansiyometrik tabanlı biyosensörler, çeşitli biyolojik bileşiklerin tespitini ilerletme ve çeşitli hastalıkların erken teşhisine yardımcı olma potansiyeline sahiptir (23).

b) Amperometrik Biyosensörler: Amperometrik biyosensörler, bir redoks reaksiyonu meydana geldiğinde elektrotlar arasındaki akım akışını ölçer. Amperometrik biyosensörler antijenleri, antikorları, proteinleri, DNA parçalarını, pH değişikliklerini, ağır metal iyonlarını vb. tespit etme yeteneğine sahiptir. En çok araştırılan amperometrik biyosensör sistemi muhtemelen glukoz biyosensörüdür. Bu sistemde, glukoz oksidaz (GOx), glukonolakton ve hidrojen peroksit üretmek için glikozun oksijenle reaksiyonunu katalize eder. Sinyal genellikle, çalışan elektrotta bir aracının veya hidrojen peroksitin redoks reaksiyonunun neden olduğu glikoz konsantrasyonuna karşı akım (amper) olarak gösterilir (24,25).

c) Voltametrik Biyosensörler: Voltametri, bir potansiyelin değiştirilmesi ve ardından ortaya çıkan akımın ölçülmesi yoluyla analit hakkında bilgilerin elde edildiği elektro-analitik yöntemler kategorisine aittir. Bu nedenle, bir amperometrik tekniktir. Sıklık voltametri en yaygın kullanılan voltametrik yöntemlerden biridir ve analit çözeltilerinin redoks potansiyeli ve elektrokimyasal reaksiyon hızları (örn. kimyasal hız sabiti) hakkında bilgi edinmek için yararlıdır (5,12).

d) Kondüktometrik Biyosensörler: Kondüktometrik biyosensörler, bir elektrokimyasal reaksiyon (analitin iletkenlik özelliklerindeki değişiklik) nedeniyle elektrot çifti arasındaki iletkenlikte ortaya çıkan değişikliği nicelendirir. Kondüktometrik ve empedimetrik biyosensörler genellikle canlı biyolojik sistemlerdeki metabolik süreçleri izlemek için kullanılır.

Kondüktometrik biyosensörlerin önemli avantajları vardır: Referans elektrot kullanımına ihtiyaç duymazlar; düşük genlikli alternatif voltajda çalışırlar, böylece elektrotlarda Faraday işlemlerini önlerler; ışığa karşı duyarsızdırlar; ve ucuz bir ince film standart teknolojisi kullanılarak minyatürleştirilebilir ve kolayca entegre edilebilirler (26).

e) Empedimetrik Biyosensörler: Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), çok çeşitli kimyasal ve fiziksel özelliklerin hassas bir göstergesidir. Empedimetrik biyosensörler, hedefin seçici bağlanması meydana geldiğinde sensör yüzeyindeki yük iletkenliği ve kapasitanstaki değişiklikleri ölçer. Şu anda empedimetrik biyosensörlerin geliştirilmesine yönelik artan bir eğilim gözlemlenmektedir (27,28).

Optik Biyosensörler

Optik biyosensör, bir optik dönüştürücü sistemi ile entegre edilmiş biyolojik tanıma algılama elemanı içeren kompakt bir analitik cihazdır. Bir optik biyosensörün temel amacı, ölçülen bir maddenin (analitin) konsantrasyonuyla orantılı bir sinyal üretmektir. Optik biyoalgılama genel olarak iki genel moda ayrılabilir: Etiketsiz ve etiket tabanlı. Kısaca, etiketsiz bir modda, algılanan sinyal, doğrudan analiz edilen materyalin dönüştürücü ile etkileşimi sonucu üretilir. Buna karşılık, etiket tabanlı algılamada, etiket kullanılır ve optik sinyal daha sonra kolorimetrik, floresan veya ışıldayan (luminesan) bir yöntemle üretilir. Optik biyosensör, biyotanıma elemanları olarak enzimler, antikolar, antijenler, reseptörler, nükleik asitler, tüm hücreler ve dokular dahil olmak üzere çeşitli biyolojik malzemeleri kullanılabilir. En yaygın olarak kullanılan optik tabanlı biyosensörler floresan tabanlı optik biyosensörler, kemilüminesans tabanlı optik biyosensörler, yüzey plasmon rezonans (SPR) tabanlı optik biyosensörler ve fiber optik tabanlı optik biyosensörlerdir. Optik biyosensörler, birçok biyolojik ve kimyasal maddenin doğrudan, gerçek zamanlı ve etiketsiz olarak saptanmasını sağladıklarından, geleneksel analitik tekniklere göre büyük avantajlar sunar (12,29).

a) Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Biyosensörler: SPR, yüzey plazmon dalgası aracılığıyla bir metal yüzeyde moleküler etkileşimin neden olduğu kırılma indisindeki kaymayı tespit eden teknolojidir. SPR, biyomoleküler etkileşimlerin kinetiğini etiketsiz bir şekilde analiz eder. SPR tabanlı biyosensörler, şu anda optik biyoalgılama uygulamaları için en yaygın olarak kullanılan cihazlardır. Özellikle tıbbi teşhis ve sağlık hizmetlerinde, kullanımında geleneksel virüs tespit yöntemlerini geride bırakmıştır (30, 31).

b) Floresan Bazlı Optik Biyosensörler: Floresan, tespit eden analit veya moleküller için etiketlemeyi içeren optik doğa olayıdır. Bu olay, floresan bazlı optik biyosensörlerin tasarımına çok dikkat çekmiştir. Bu tür biyosensör, yüksek seçiciliği, duyarlılığı ve kısa tepki süresi nedeniyle tıbbi teşhis ve çevre ve gıda kalitesi izleme uygulamaları için en çok araştırılan biyosensörlendendir. (12).

c) Kemilüminesans Bazlı Optik Biyosensörler: Kemilüminesans tabanlı sensörler temel olarak üç tiptedir: (1) biyo-kemilüminesans tabanlı, (2) termo-kemilümi-

nesan tabanlı ve (3) elektrokemilüminesan tabanlı. Biyo-kemilüminesan tabanlı sensörler, biyolojik immün deney sistemlerinde kullanıldıklarında çok hassastırlar; attomol konsantrasyonlarına kadar tespit edebilirler. Kemilüminesan teknolojisi biyolojik olarak önemli moleküller için yaygın olarak kullanılmaktadır (32).

d) Optik-Fiber Bazlı Optik Biyosensörler: Optik fiber tabanlı biyosensörler, biyolojik bir tanıma elemanının kullanımını bir optik fiber veya optik fiber demeti ile birleştirir. Algılama için kullanılan biyolojik tanıma elemanının doğasına göre sınıflandırılırlar: Enzim, antikor/antijen (immunoassay), nükleik asit, tam hücre ve biyomimetik ve metaller ve kimyasallardan fizyolojik materyallere kadar çeşitli analitler için kullanılabilirler (33).

BIYOSENSÖRLERDE İMMOBİLİZASYON TEKNİKLERİ

Bir biyosensörün biyolojik tanıma kısmını tasarlamak için dönüştürücünün yüzeyinde biyolojik elementlerin hareketsiz hale getirilmesi gereklidir. Sensör hazırlamanın kilit yönlerinden biri, uygun immobilizasyon tekniğinin seçilmesidir. Bunun nedeni, immobilizasyondan sonra biyotanıma elemanının/molekülünün etkisiz hale gelmesi veya süzülerek uzaklaşması ihtimalinin olmasıdır.

Son yıllarda biyotanıma elemanının immobilizasyonunda birçok yöntem geliştirilmiştir ve evrensel uygun bir teknik belirlemek oldukça güçtür. Uygun bir immobilizasyon tekniğinin seçimi, seçilen biyolojik tanıma elemanına, dönüştürücüye ve fiziksel-kimyasal ortama ve analitin özelliklerine bağlıdır.

Enzimlerin immobilizasyonunda başlıca 5 yöntem kullanılmaktadır.

- Kovalan bağlama
- Tutuklama
- Adsorpsiyon
- Çapraz bağlama
- İyonik bağlama (12,35,36).

Adsorpsiyon

Bu metot immobilizasyon yöntemleri içerisinde en kolay metottur. Adsorpsiyon tekniğinde, biyolojik tanıma elemanı van der Waals kuvveti, elektrostatik kuvvet, iyonik bağ veya hidrojen bağı gibi zayıf çekici kuvvetlerle inert katı malzemenin dış yüzeyi üzerinde hareketsiz hale getirilir. Bu yöntemin dezavantajları arasında immobilizasyonun pH, sıcaklık ve iyonik kuvvetteki değişikliklere duyarlı olması, zayıf etkileşimlerle birbirine bağlanması ve zayıf çalışma ve saklama stabilitesine sahip olması yer alır (12,37).

Tutuklama

Bu yöntemde, biyolojik tanıma elemanları, kovalan veya kovalan olmayan bağlar yoluyla üç boyutlu matriksler içinde fiziksel olarak tutulur. Tutulma polimer matriks içindeki kafeslerde veya yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ile gerçekleştirilebilir. Bu yöntemde biyolojik tanıma elemanları herhangi bir kimyasal modifikasyona uğramadığından yöntem çok büyük bir avantaja sahiptir. Bu sebeple biyotaniyecilerin kendine özgü özellikleri değişmemektedir. Ancak enzimler jel matrikslerde deaktive olabilmektedir. Enzim kaçıışı da aynı zamanda bir problemdir (3,12,37).

Kovalan Bağlama

Kovalan bağlanma ile biyolojik tanıma elemanların (enzim) immobilizasyonu, bu moleküllerin üzerindeki fonksiyonel gruplar ile bir destek matriksi arasında kovalan bağlarla kararlı komplekslerin oluşturulduğu en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Biyotanıma elemanının (enzim) katı desteğe bağlanma prosedürü genellikle iki aşamadan geçer: (1) glutaraldehit veya karbodiimid gibi bağlayıcı moleküller kullanılarak yüzeyin aktivasyonu ve (2) aktive edilmiş desteğe enzimin kovalan bağlanması. Bağlayıcı moleküller, kovalan bağ yoluyla yüzey ve biyomolekül arasında köprü görevi gören çok işlevli reaktiflerdir (glutaraldehit veya karbodiimid). Doğrudan kovalan bağlanmanın avantajları, çevresel değişikliklere karşı güçlü direnç, biyolojik tanıma elemanının (enzim) az sızıntısı ve biyolojik tanıma elemanı (enzim) ile matriks arasında güçlü bağ oluşumunu içerir. Bu yöntemin ana dezavantajları, sert kimyasalların kullanılması ve geliştirilen matriksin bir kez kullanıldıktan sonra yeniden üretilmemesidir (12,38).

Çapraz Bağlama

Çapraz bağlama mekanizması, biyotanıma elemanları (enzimler) arasında veya biyotanıma elemanları ile işlevsel olarak inert proteinler (örneğin sığır serum albümini) arasında moleküller arası kovalan çapraz bağlantıların yaratılması yoluyla gerçekleşir.

Avantajları, daha az enzim sızıntısı, daha güçlü kimyasal bağlanma ve uygun stabilize edici ajanlar kullanılarak biyotanıma elemanı için ortamın ayarlanması olanağıdır. Dezavantajları, matriks ve protein yerine protein molekülleri arasında kovalan çapraz bağların oluşması ve bu kısmi protein yapısının denatürasyonu sonucunda çapraz bağlama ile immobilizasyonunun sınırlanmasıdır (12).

Adsorpsiyon

Adsorpsiyon, van der Waals kuvvetleri, iyonik etkileşimler ve hidrojen bağına içeren taşıyıcı ve enzim arasında üretilen fiziksel etkileşimlerden yararlanır. Bağ-

lanma oldukça zayıftır ve asıl önemli olan bağlanmanın enzimin doğal yapısını değiştirmemesidir. Bu, enzimin aktif bölgelerinin yapısal olarak şeklinin bozulmasını engeller ve enzim aktivitesinin korumasını sağlar (39).

BIYOSENSÖRLERİN KULLANIM ALANLARI

Biyosensörler gıda endüstrisi, sağlık, tarım, çevre kirliliği, askeri alan, eczacılık, kriminal ve denizcilik sektörü gibi birçok alanda uygulanmakta ve geleneksel yöntemlere göre daha iyi stabilize ve hassasiyet sağlamaktadır (40,41). Biz bu bölümde biyosensörlerin biyokimya alanındaki uygulamaları ve bu alandaki yeni araştırmalar üzerinde duracağız.

Biyosensörlerin Biyokimya Alanındaki Kullanımı

Çeşitli insan hastalıkları ilerlemelerinin ilk aşamalarında bu hastalıkları teşhis etmek, hastaların başarılı bir şekilde tedavi edilmesini sağlamak için esasen çok önemlidir. Bu nedenle, hastalıkları etkin bir şekilde tespit etmek için biyosensörler gibi basit, hassas ve uygun maliyetli teşhis araçlarının geliştirilmesi esastır. Biyosensörler, hastalık tanımlama, önleme, rehabilitasyon, hasta sağlığı gözetimi ve insan sağlığı yönetimi için başarıyla uygulanmaktadır. Biyosensörler ayrıca bakteri, patojen ve virüs mikroorganizmalarını tespit etmek için de kullanılabilir (42,43).

Biyosensörler taşınabilir cihazlarda bakım noktasında izleme (point of care testing) için sıklıkla kullanılmaktadır. Glukoz, bağımlılık, hamilelik ve benzeri amaçlarla kullanılan taşınabilir cihazlarda biyosensörler bulunur. Ayrıca implant edilebilir biyosensörler, rutin hasta bakımı için ve hastalıkları tedavi etmek için heyecan verici bir güce sahiptir, ancak çözülmesi ve doğrulanması gereken bazı teknik zorluklara sahiptir (43,44,45).

Bugün karşı karşıya kalınan en büyük ikilem, dünyada yaklaşık bir milyon insanın muzdarip olduğu kalp yetmezliğidir. Kardiyovasküler hastalıkların saptanması için teknikler arasında immünoafinite kolon testi, florometrik analiz ve enzime bağlı immünsorbent testi (ELISA) yer alır. Bunlar zahmetlidir, kalifiye personel gerektirir ve zaman alıcıdır. Bu nedenle, kardiyovasküler hastalıkların tespiti için bir dizi taşınabilir, hızlı ve düşük maliyetli biyoalgılama cihazına yönelik artan bir talep vardır. Biyosensörler, pahalı ve zaman alıcı laboratuvar testlerinin önerildiği hastane ortamına girmeye gerek kalmadan kardiyovasküler hastalıkların erken teşhisinde önemli bir rol oynayabilir. Son on yılda, sağlık bakım maliyetlerini azaltmak için çeşitli kardiyak belirteçleri tespit etmek amacıyla biyosensörler geliştirilmiştir. Kanda tespit edilebilen ve kardiyovasküler hastalık

riskini tahmin edebilen tanılabilir ve prognostik biyobelirteçlerin bulunmasına büyük ilgi vardır. Bunlardan C-reaktif protein (CRP) en iyi bilinen biyobelirteçtir ve bunu kardiyak troponin I veya T (cTnI/T), miyoglobin (Mb), lipoprotein ile ilişkili fosfolipaz A2, interlökin-6 (IL-6), takip eder. İnterlökin-1 (IL-1), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), miyeloperoksidaz (MPO) ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) kardiyovasküler olayları tahmin etmek için kullanılmıştır. Kardiyovasküler biyobelirteçlerin tespiti için bir dizi sensör geliştirilmiştir. Bu biyosensörler elektrokimyasal, optik, piezoelektrik veya manyetik temelli olabilir. Farklı optik tabanlı biyosensör platformlarında bir dizi farklı kardiyak biyobelirteç tespit edilmiştir. Mevcut araştırmalar daha çok çoklu analit tespiti için metodolojilere ve immünosensörlerin çip tabanlı mikroakışkan platformlara entegrasyonuna odaklanmıştır. Örneğin, CRP, Mb ve cTnI'yi içeren multianalit kardiyak belirteç tespiti için kendi kendini düzenleyen mikroakışkan ağ tabanlı bir immünosensör tasarlanmıştır (46). Ayrıca, son zamanlarda, optik fiberlere dayalı SPR, kardiyak spesifik biyobelirteçler olan BNP , cTnI, Mg , CRP, sinir büyüme faktörü ve IL-6'nın saptanması için kullanılmıştır. Elektrokimyasal yöntemlere dayalı son yirmi yıl içinde cTnI/T, Mb, CRP, lipoprotein ile ilişkili fosfolipaz A2, IL-6, LDL ve MPO dahil olmak üzere kardiyak belirteçler tespit edilmiştir (47,48).

Diyabetik hastalarda diyabet belirteçlerinin araştırılması ve izlenmesi için çoklu testler yaygındır. Diyabet takibinde diyabetik hastalar tarafından kan glukoz seviyesinin kendi kendine izlenmesini bu sistemlerle yapılabilmektedir. Kan glukozunu ölçen farklı glukoz sensörleri ticari olarak vardır, glukoz biyosensörlerindeki gelişmeler yıllar içinde değişmiştir. Clark ve Lyons ilk olarak 1962'de glukoz oksidaz enzimi (GOx) kullanımı ile elektrokimyasal yaklaşıma bağlı olan ilk glukoz biyosensörünü geliştirdiler. Bu birinci nesil glukoz biyosensörü elektrokimyasal yaklaşımı nedeniyle, dönemin yöntemlerine göre yüksek düzeyde hassasiyet sunmuş ve imalatı nispeten düşük maliyetli olmuştur. Birinci nesil glukoz biyosensörlerinin bazı sınırlamalarının üstesinden gelmek için ikinci ve üçüncü nesil glukoz biyosensörleri üretilmiştir. Bununla birlikte enzimatik olmayan glukoz sensörleri, dördüncü nesil glukoz biyosensörleri olarak kabul edilebilir. Glukoz oksidasyonu için katalitik elektrot üretimi, enzimatik olmayan glukoz biyosensörlerinin ana mottosudur (48,49,50).

Kanser en ölümcül hastalıklardan biridir ve son zamanlarda birçok araştırmacı kanserin erken teşhisi için biyosensör geliştirmiştir. Kanserde, biyosensör tarafından çeşitli tümör belirteçleri (Prostat-spesifik antijen (PSA), Kanser antijen 125, Kanser antijen 15-3, Kanser testis antijen, Reseptör bağlı kanser antijen

(RCAS1)) analit olarak tespit edilmektedir. Bu nedenle, biyosensörler, tümör hücreleri tarafından eksprese edilen ve/veya salgılanan belirli proteinlerin seviyelerini ölçerek, bir tümörün mevcut olup olmadığını, varsa iyi huylu veya kanserli olup olmadığını ve tedavinin kanserli hücreleri azaltmada veya ortadan kaldırmada etkili olup olmadığını tespit edebilir. Çoğu kanser türü birden fazla biyobelirteç içerdiğinden, birden fazla analiti tespit edebilen biyosensörler, kanser teşhisi ve izlenmesinde özellikle yararlı olabilir. Bir biyosensörün birden fazla belirteci aynı anda test etme yeteneği, yalnızca teşhise yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda zaman ve finansal kaynak tasarrufu sağlar. Ayrıca biyosensörler sadece hastalığı teşhis etmek ve izlemek için değil, aynı zamanda tedaviye prognostik bir yaklaşım sağlamak için de kullanılırlar (49,50,51).

Salmonella, *Klebsiella* ve *Staphylococcus* gibi yaygın gıda kaynaklı patojenlerin veya HIV ve dang virüsü gibi virüslerin tespiti, ilişkili hastalıkların kontrolü için biyosensörler hayati önem taşımaktadır. Viral bazlı biyosensörlerin iki ana biyolojik tanıma stratejisi vardır: Viral nükleik asit (NA) dizisinin tespiti ve yüzey proteinleri/antijenleri gibi spesifik viral biyomoleküllerin tespiti. Nanoteknoloji tabanlı biyosensörler, nükleik asit probu, antikor veya hedef yapıya afinitesi olan başka bir spesifik molekül ile etiketlendikten sonra yüksek özgüllük ve hassasiyet gösterir. Virüs biyoalgılamasında, özellikle floresan, ışık saçılması, yüzeyle güçlendirilmiş Raman saçılması (SERS), elektrokimyasal, kuartz kristal mikrobaleans (QCM) ve yüzey plazmon rezonans (SPR) sensörlerinde gelişmeler sağlanmıştır (52, 53). Aralık 2019'dan bu yana, şiddetli akut solunum sendromuna (SARS-CoV-2) neden olan yeni bir koronavirüs [COVID-19], ilk olarak Çin'in merkezindeki Wuhan şehrinde rapor edildi ve küresel olarak bildirilen vaka sayısında patlamaya yol açtı. Bu pandemiyi kontrol altına almak için doğru tanı ve hızlı teknoloji kullanılarak doğru teşhis çok önemlidir. RT-PCR testi, erken virüs tanımlaması için altın standart olarak kabul edilir, ancak teknik karmaşıklığı nedeniyle, hasta başı tanı olarak sınırlı kullanımı vardır. Hızlı, güvenilir ve hassas yeni COVID-19 biyosensörleri geliştirmeye büyük ilgi vardır. Genel olarak, SARS-CoV-2'nin saptanması için biyosensör platformları üç temel duruma dayanır. Bunlar sırasıyla; hedefi tanımlama (ör. viral RNA ve proteinler veya insan immüno globulinleri), tanımlama yöntemleri (aptamerlere, antikorlara, nükleik asit problemlerine, reseptörlere dayalı), sinyallerin ve transdüksiyon sistemlerinin amplifikasyonu (elektrik, yüzey plazmon rezonansı, elektrokimyasal, optik, mekanik sistemler ve floresan sinyallerine dayalı) (54,55,56).

KAYNAKÇA

1. Singh M, Verma N, Garg AG. et al. Urea biosensors, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2008;134(1):345-351. doi: 10.1016/j.snb.2008.04.025.
2. Koncki R. Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis. *Analytica Chimica Acta*. 2007;599(1):7-15. doi: 10.1016/j.aca.2007.08.003.
3. Vardar G. Yeni Enzim Polimer Konjugatlarına Dayalı Glukoz Biyosensörü Hazırlanması ve Uygulamaları. Yüksek Lisans Tezi. Yıldız Teknik Üniversitesi, 2014. Mehrotra P. Biosensors and their applications - A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 2016;6(2):153-9. doi: 10.1016/j.jobcr.2015.12.002.
4. Mehrotra P. Biosensors and their applications - A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 2016;6(2):153-9. doi: 10.1016/j.jobcr.2015.12.002.
5. Grieshaber D, MacKenzie R, Vörös J, Reimhult E. Electrochemical Biosensors - *Sensor Principles and Architectures*. *Sensors (Basel)*. 2008;8(3):1400-1458. doi: 10.3390/s80314000
6. Kar S, Sarswat PK. Biosensors and Advanced Sensors. Palys B (ed.) *Handbook of Graphene*. New Jersey: Wiley;2017.p. 3-14
7. Palchetti I, Mascini M. Biosensor Technology: A Brief History. In: Malcovati P, Baschiroto A, D'Amico A, Di natale C. (eds). *Sensors and Microsystems*, Amsterdam: Elsevier; 2009. p. 15-24
8. Telefoncu A. *Biyosensörler*. İzmir: Ege Üniversitesi yayın evi; 1999.
9. Lee YH, Mutharasan R. Biosensors. In: Wilson J.S. (ed). *Sensor Technology Handbook*. Burlington: Elsevier;2005.p.161-180
10. Tüylek Z. Biyosensörler ve Nanoteknolojik Etkileşim. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2017;6(2): 71-80. doi:10.17798/bitlisfen.299340
11. Meshram BD, Agrawal AK, Adil S. Biosensor and its Application in Food and Dairy Industry: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*. 2018; 7(2): 3305-3324. doi: 10.20546/ijcmas.2018.702.397
12. Naresh V, Lee N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors*. 2021; 21(4):1109. doi: 10.3390/s21041109
13. Shukla SK, Govender PP, Tiwari A. Chapter Six - Polymeric Micellar Structures for Biosensor Technology, *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly*. 2016; 24:143-161. doi: 10.1016/bs.abl.2016.04.005
14. Rocchitta G, Spanu A, Babudieri S. et al. Enzyme Biosensors for Biomedical Applications: Strategies for Safeguarding Analytical Performances in Biological Fluids. *Sensors (Basel)*. 2016;16(6):780. doi: 10.3390/s16060780.
15. Nguyen HH, Lee SH, Lee UJ. et al. Immobilized Enzymes in Biosensor Applications. *Materials (Basel)*. 2019; 12(1):121. doi: 10.3390/ma12010121.
16. Ayyar BV, Arora S. Antibody-based biosensors for detection of veterinary viral pathogens. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*.2013; 1 (4): 37 – 44.
17. Song S, Wang L, Li J. Aptamer-based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2008; 27(2): 108-117. doi: 10.1016/j.trac.2007.12.004.
18. Gui Q, Lawson T, Shan S, et al. The Application of Whole Cell-Based Biosensors for Use in Environmental Analysis and in Medical Diagnostics. *Sensors (Basel)*. 2017; 17(7):1623. doi: 10.3390/s17071623.
19. Cho IH, Kim DH, Park S. Electrochemical biosensors: perspective on functional nanomaterials for on-site analysis. *Biomaterials Research*, 2020; 24(6). doi: 10.1186/s40824-019-0181
20. Srivastava KR, Awasthi S, Mishra PK. Biosensors/molecular tools for detection of waterborne pathogens. In: Narasimha M, Prasad V, Grobelak A. (eds). *Waterborne Pathogens*, Amsterdam: Elsevier; 2020.p. 237-277.
21. Li H, Liu X, Li L. et al. CMOS Electrochemical Instrumentation for Biosensor Microsystems: A Review. *Sensors (Basel)*. 2016;17(1):74. doi: 10.3390/s17010074.

22. Yunus S, Jonas AM, Lakard B. Potentiometric Biosensors. In: Roberts G.C.K. (eds) *Encyclopedia of Biophysics*. Berlin: Springer; 2013. p. 51-73.
23. Karimi-Maleh H, Orooji Y, Karimi F. et al. A critical review on the use of potentiometric based biosensors for biomarkers detection. *Biosensors Bioelectronics*. 2021;184(1) 113252. doi: 10.1016/j.bios.2021.113252.
24. Pan HM, Gonuguntla SK, Li S. et al. Conjugated Polymers for Biosensor Devices. In: Ducheyne P. (ed). *Comprehensive Biomaterials II*, Amsterdam: Elsevier; 2017. p. 716-754.
25. Villagrasa JP, Colomer Farrarons, J, Miribel PL. Bioelectronics for Amperometric Biosensors. In: Rinken, T (ed). *State of the Art in Biosensors - General Aspects*. London: IntechOpen; 2013.
26. Dzyadevych S, Renault NJ. Conductometric biosensors. In: Schaudies RP (ed). *Biological Identification*, Amsterdam: Elsevier; 2014. p.153-193.
27. Kim M, Iezzi R Jr, Shim BS. et al.. Impedimetric Biosensors for Detecting Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Based on Poly(3,4-ethylene dioxythiophene) (PEDOT)/Gold Nanoparticle (Au NP) Composites. *Frontiers in Chemistry*. 2019;7:234. doi: 10.3389/fchem.2019.00234
28. Guan JG, Miao YQ, Zhang QJ. Impedimetric biosensors. *The Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2004;97(4):219-26. doi: 10.1016/S1389-1723(04)70195-4.
29. Damborský P, Švitel J, Katrlík J. Optical biosensors. *Essays in Biochemistry*. 2016 ;60(1): 91-100. doi: 10.1042/EBC20150010.
30. Singh P. Surface Plasmon Resonance: A Boon for Viral Diagnostics. *Reference Module in Life Sciences*. 2017; B978-0-12-809633-8.12245-9. doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.12245-9.
31. Chen C, Wang J. Optical biosensors: an exhaustive and comprehensive review. *The Analyst*. 2020;145(5):1605-1628. doi: 10.1039/c9an01998g.
32. Anand U, Chandel AKS, Oleksak P. et al. Recent advances in the potential applications of luminescence-based, SPR-based, and carbon-based biosensors. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2022; 106(8):2827-2853. doi: 10.1007/s00253-022-11901-6.
33. Monk DJ, Walt DR. Optical fiber-based biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2004; 379(7-8): 931-45. doi: 10.1007/s00216-004-2650-x.
34. Ramanathan K, Danielsson B. Principles and applications of thermal biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 2001;16(6):417-23. doi: 10.1016/s0956-5663(01)00124-5.
35. Gianfreda L, Scarfi MR. Enzyme stabilization: state of the art. *Mol Cell Biochem*. 1991;100(2):97-128. doi: 10.1007/BF00234161.
36. Padma VI, Ananthanarayan I. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*.2008;43(10):1019-1032. doi:10.1016/j.procbio.2008.06.004
37. Dutta R. *Fundamentals of Biochemical Engineering*, Berlin: Springer;2008
38. Nguyen HH, Kim M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, 2017; 26(6): 157-163. doi: 10.5757/ASCT.2017.26.6.157
39. Jesionowski T, Zdarta J, Krajewska B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption* 2014; 20, 801–821. doi: 10.1007/s10450-014-9623-y
40. Mehrotra P. Biosensors and their applications - A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 2016;6(2):153-9. doi: 10.1016/j.jobcr.2015.12.002
41. Mello LV, Watson HR. A special issue of Essays in Biochemistry on current educational developments in molecular bioscience. *Essays in Biochemistry*. 2022;66(1):1-3. doi: 10.1042/EBC20220032.
42. Alhadrami HA. Biosensors: classifications, medical applications, and future prospective. *Biotechnol Applied Biochemistry*. 2018;65(3):497-508. doi: 10.1016/j.sintl.2021.100100
43. Haleem A, Javaid M, Singh RP. et al. Biosensors applications in medical field: A brief review. *Sensors International*, 2021; 2: 100100. doi: 10.1016/j.sintl.2021.100100.
44. Tereshchenko A, Bechelany M, Viter R. Optical biosensors based on ZnO nanostructures: advantages and perspectives. A review. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2016;229:664-677
45. Ravindra, NM, Prodan C, Fnu S. et al. Advances in the manufacturing, types, and applications of biosensors. *JOM*. 2007; 59: 37–43 doi:10.1007/s11837-007-0150-0.

46. Wolf M, Juncker D, Michel B.etal. Simultaneous detection of C-reactive protein and other cardiac markers in human plasma using micromosaic immunoassays and self-regulating microfluidic networks. *Biosensors and Bioelectronics*. 2004;19(10):1193-202. doi: 10.1016/j.bios.2003.11.003
47. Qureshi A, Gurbuz, Y, Niazi YH. Biosensors for cardiac biomarkers detection: A review. *Sensors and Actuators B: Chemical*.2012; 171-172:62-76. doi: 10.1016/j.snb.2012.05.077.
48. Metkar SK, Girigoswami, K.Diagnostic biosensors in medicine – A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.2019; 17:271-283. doi: 10.1016/j.bcab.2018.11.029.
49. Wang, J. Glucose Biosensors : 40 Years of Advances and Challenges. *Electroanalysis*. 2001;13(12):983-988. doi: 10.1002/1521-4109(200108)
50. Milton RD, Giroud F, Thumser AE et al. Hydrogen peroxide produced by glucose oxidase affects the performance of laccase cathodes in glucose/oxygen fuel cells: FAD-dependent glucose dehydrogenase as a replacement. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2013;15(44):19371-9. doi: 10.1039/c3cp53351d
51. Bohunicky B, Mousa SA. Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. *Nanotechnology, Science, Applications*. 2010;4:1-10. doi: 10.2147/NSA.S13465.
52. Krejcova L, Michalek P, Merlos Rodrigo M. Et al. Nanoscale virus biosensors: state of the art. *Nanobiosensors in Disease Diagnosis*. 2015;4:47-66. doi:10.2147/NDD.S56771.
53. Topal AE., Ozkan AD, Dana A. et al. Biosensors for Early Disease Diagnosis. In: Guler MO, Tekinay AB (eds). *Therapeutic materials*. New Jersey: Wiley;2016.p. 235-270.
54. Irvani S. Nano- and biosensors for the detection of SARS-CoV-2: challenges and opportunities. *Material Advances*.2020; 1:3092-3103. doi:10.1039/D0MA00702A
55. Yasri S, Wiwanitkit V. Sustainable materials and COVID-19 detection biosensor: A brief review. *Sensors International*, 2022;3:100171. doi:10.1016/j.sintl.2022.100171.
56. Abid SA, Ahmed Muneer A, Al-Kadmy IMS. Et al.Biosensors as a future diagnostic approach for COVID-19. *Life Sciences*. 2021;273:119117. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119117.