

TIBBİ ÖLÇÜM VE ANALİZLERDE KULLANILAN BİYOSENSÖRLER*

Binnur SAĞBAŞ**

*Yıldız Teknik Üniversitesi,
Makine Mühendisliği Bölümü,
Beşiktaş, İstanbul
e-posta: bzeybek@yildiz.edu.tr*

Numan DURAKBAŞA

*Viyana Teknik Üniversitesi,
İmalat ve Ölçme Tekniği Departmanı,
Viyana, AVUSTURYA
e-posta: durakbasa@chello.at*

ÖZET

Biyosensörler biyolojik sistemler ile kombine edilmiş sensör sistemleridir. Temel olarak iki kısımdan oluşmaktadır; bunlardan birincisi biyolojik algılayıcı, diğeri ise fizikokimyasal dönüştürücüdür (transducer). Biyolojik algılayıcı eleman hedef analit ile seçici olarak etkileşimde bulunan biyokatalistler (enzim, mikroorganizma, doku malzemeleri) veya biyoligandlar (antikor, nükleik asit, lektin) olabilmektedir. Dönüştürücü ise hedef analit ile biyolojik algılayıcı arasındaki etkileşime bağlı olarak ortaya çıkan fiziksel cevabı ölçülebilir bir sinyale dönüştürmektedir. Biyolojik ve sentetik süreçlerin izlenebilme ve anlaşılabilme olanağı sağlayan biyosensörler, tıbbi ölçüm ve analizlerin yanında, çevresel gözlem ve kontrollerde, savunma sanayinde, tarım, gıda ve ilaç endüstrilerindeki kullanım alanlarıyla günlük hayatta önemli bir role sahip olmaktadır.

Bu derleme makalede tıbbi ölçüm ve analizlerde kullanılan biyosensörlerin karakteristikleri tanımlanmış ve literatürde yer alan değişik sınıflandırmalara yer verilmiştir. Biyosensörlerin tasarım ve imalatında kullanılan malzeme ve teknikler derlenerek, bu alandaki gelişmelerin yer aldığı literatür çalışmaları özetlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyosensör, tıbbi ölçüm, biyomalzeme, biyomedikal uygulama, biyosensör imalatı

Biosensors Used in Medical Measurements and Analyses

ABSTRACT

Biosensors are sensor systems that are combined with biological systems. They consist of two main parts; one of them is biological recognition element and the other one is physicochemical transducer. Biological recognition element can be biocatalysts (enzyme, microorganism, tissue materials) or bioligands (antibodies, nucleic acids, lectins) that interact selectively with the target analyte. Transducer converts the physical response resulting from the interaction between the target analyte and biological recognition element into a measurable signal. Biosensors which provide monitoring biological and synthetic processes can be used besides medical measuring and analyzing, for environmental observations and controls, defense industry, agriculture, food and pharmaceutical industry. Thus, they have an important role in daily life.

In this review, characteristics of biosensors that are used in medical measuring and analyzing have been determined and classifications of biosensors according different features that are found in literature are presented.

Keywords : Biosensor, medical measurement, biomaterial, biomedical application, biosensor manufacturing

** İletişim yazarı

* Bu makale 6-7 Kasım 2009 tarihlerinde Makina Mühendisleri Odası'nda düzenlenen III. Ulusal Tıbbi Cihazlar İmalatı Sanayi Kongresi ve Sergisi'nde bildiri olarak sunulmuştur

GİRİŞ

Son yıllarda biyomalzeme alanında sağlanan hızlı gelişmelere bağlı olarak artan biyomalzeme çeşitliliği ve kullanımı, algılama sistemlerinin iyileştirilmesi, tasarım ve işlevsellik açısından yeni biyosensörlerin geliştirilmesi ihtiyacını doğurmuştur. Biyolojik ve sentetik süreçlerin izlenebilme ve anlaşılabilme olanakları sağlayan biyosensörler, tıbbi analizlerde, çevresel gözlem ve kontrollerde, tarım, gıda ve ilaç endüstrilerindeki kullanım alanlarıyla günlük hayatta önemli bir role sahip olmaktadır [1].

Biyosensörlerin geliştirilmesinde ilk olarak 1962'de Clark ve Lyons tarafından geliştirilen pH ve oksijen elektrodunda enzimatik membran kullanılmış, üre ve kandaki glukoz miktarının ölçülebileceği ihtimali üzerinde durulmuştur. 1967'de ise Updike ve Hicks tarafından, oksijen elektrodun üzerinde glukoz oksidaz içeren bir jelin polimerize edilmesi ile elde edilen bir enzim elektrodu hazırlanmıştır. Prensipte olarak, elektrod glukoz ve oksijen içeren biyolojik bir çözelti ile temasa geçtiğinde her iki bileşik de enzimatik membranın içine geçmektedir. Daha sonra elektrod çözelti içindeki oksijeni kullanarak glukozu glukonik aside oksitlemektedir. Burada oksijen elektrod, glukoz konsantrasyonu ile doğru orantılı olan oksijenin kısmi basıncındaki azalmayı ölçmektedir. Bu buluş biyolojik analizler açısından son derece önemli bir adım olmuş, normal sensör yapısının biyolojik bir sistem ile birleştirilmesi çözeltideki değişik yapıların teşhis edilmesinde büyük bir kolaylık sağlamıştır. Buradan yola çıkılarak yeni bir sensör sınıfı olan biyolojik sensörler geliştirilmiştir [2].

Biyosensörler amperometrik, potansiyometrik, termal, piezoelektrik, akustik ve optik sensörler gibi var olan sensör yapıları ile enzimler, hücreler, mikroorganizmalar, kimyasal reseptörler ve immunolojik ajanlar gibi biyolojik sistemlerin kombinasyonu ile ortaya çıkmışlardır [2].

Sağlık alanından tarıma, gıdadan savunma sanayiine kadar pek çok alanda giderek artan öneme sahip olan biyosensörler, yeni teknolojilerin de kullanılmasıyla gelişmeye devam etmektedir. Bu alanda çalışmalarını sürdüren araştırmacılar yakın gelecekte çok daha küçük boyutlarda, daha hassas, kullanım ömrü uzun ve daha ekonomik sensörler geliştirmeyi hedeflemektedirler.

BIYOSENSÖRLERİN GENEL PRENSİBİ VE METROLOJİK KARAKTERİSTİKLERİ

Biyolojik algılayıcı ve fizikokimyasal dönüştürücü şeklinde iki temel kısımdan oluşan biyosensörler, biyolojik sistemler ile kombine edilmiş sensör sistemleridir. Biyolojik algılayıcı eleman hedef analit ile

seçici olarak etkileşimde bulunan biyokatalistler (enzim, mikroorganizma, doku malzemeleri) veya biyoligandlar (antikor, nükleik asit, lektin) olabilmektedir. Dönüştürücü ise hedef analit ile biyolojik algılayıcı arasındaki etkileşime bağlı olarak ortaya çıkan fiziksel cevabı ölçülebilir bir sinyale dönüştürmektedir. Analit ile biyoreseptör arasında oluşan kimyasal reaksiyon renk değişimi, ışımaya, ısı oluşumu, bir osilatörün frekansındaki değişim veya iletkenlik özelliğindeki değişim gibi bir sinyal üretmektedir [3-6].

Biyosensörün oluşturulması aşamasında algılayıcı eleman ile dönüştürücünün birbirlerine uyumlu olarak seçilmeleri gerekmektedir. Örneğin ısı değişimine bağlı olarak elektriksel sinyal üreten bir termometrik dönüştürücünün kullanılabilmesi için analit ile biyolojik algılayıcı arasında oluşan reaksiyon sonucu entalpi değişimi olması gerekmektedir [7].

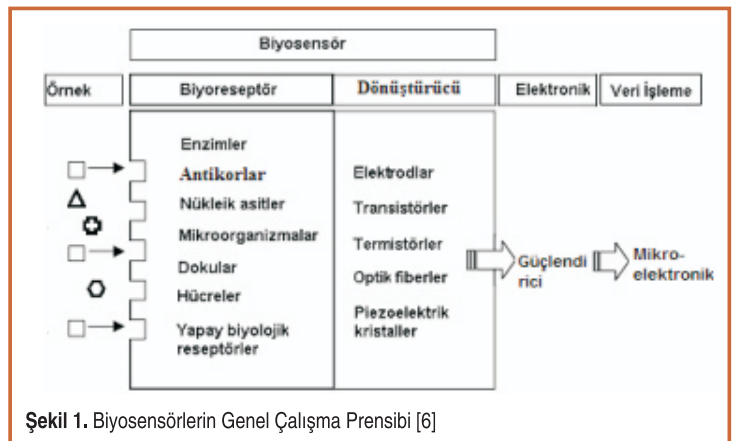
Biyosensörün incelenmekte olan analite ait doğru sonuçlar verebilmesi için bir takım özellikleri sağlaması gerekmektedir. Bu özellikler; hızlı cevaplama zamanı, seçicilik, hassasiyet, histerizis, sapma, dinamik ve tekrarlanabilirlik şeklinde sıralanabilir.

Cevaplama zamanı: Çoklu algılama yapan membranların kullanıldığı biyosensörlerde cevaplama hızı yavaşlamaktadır. Bu durum özellikle gerçek zamanlı ölçümlerin yapıldığı uygulamalarda sıkıntı yaratmaktadır. İdeal bir biyosensörde cevaplama zamanının mümkün olduğunca kısa olması beklenmektedir.

Seçicilik: Biyosensörlerin, ölçüm yapılacak ortam içerisinde yalnızca teşhis edilmek istenen molekül ile etkileşime girmesi kabiliyetidir.

Hassasiyet: Biyosensörlerin analit konsantrasyonundaki en küçük değişikliği algılayabilme kabiliyetini ifade etmektedir.

Histerizis: Bir uyarıya olan cevabın, uyarının ard arda geliş biçimine ve yönüne bağlı olma özelliğidir. Biyosensörlerde histerizisin gerçekleşmemesi ve sensör sinyalinin bir önceki cevaptan sonra temel seviyesine geri dönmesi beklenir [8].



Şekil 1. Biyosensörlerin Genel Çalışma Prensibi [6]

Sapma: Sistem karakteristiklerinin geçici değişkenlikler göstermesidir. Biyosensörlerde bu tip değişkenliklerin mümkün olduğunca düşük seviyede olması beklenir.

Dinamik: Giriş sinyalini oluşturan değişkenler arasındaki kabul edilebilir zaman aralıklarıdır.

Tekrarlanabilirlik: Aynı koşullar altında ve aynı girdi sinyalleri ile arka arkaya yapılan ölçümlerde alınan çıktı sinyallerinin değişim aralığını ifade etmektedir. İdeal bir biyosensörde aynı koşullar altında arka arkaya yapılan ölçümlerde yaklaşık olarak aynı sonuçların elde edilmesi beklenir.

BIYOSENSÖRLERİN SINIFLANDIRILMASI

Biyosensörler için pek çok sınıflandırma yapmak mümkündür. Bunlardan ilki, biyoreseptör veya dönüştürücü tipine göre sınıflandırmadır. En yaygın biyoreseptör tipleri; 1. antikor/antijen etkileşimi, 2. nükleik asit etkileşimi, 3. enzimatik etkileşimler, 4. hücrel etkileşimler (mikro-organizmalar, proteinler), 5. biomimetik malzeme etkileşimidir (sentetik biyoreseptör). Dönüştürücüye göre sınıflandırma ise, 1. optik ölçümler (ışınma, absorblama, yüzey plazma rezonans), 2. elektrokimyasal (potansiyometrik, amperometrik), 3. kütle hassasiyetine dayalı ölçümler (yüzey akustik dalga, mikro denge) şeklinde yapılabilir [9]. Benzer bir başka sınıflandırma ise biyosensörün çalışma prensibine göre yapılabilmektedir. Bu durumda biyosensörler, biyokatalitik ve biyoaffinite sensörleri şeklinde sınıflandırılmaktadır. Biyokatalitik sensörlerde reseptör olarak kullanılan enzim, mikro-organizma veya doku elemanları analiz edilecek molekül ile spesifik biyolojik bir reaksiyon ile katalitik olarak etkileşime girmektedir. Biyoaffinite sensörlerinde ise moleküler algılama antikor, reseptör veya immobilize edilmiş proteinler tarafından gerçekleştirilir [10]. Bir diğer sınıflandırma da sensörlerin kullanım durumlarına göre yapılmaktadır. Bunlar; 1. tek kullanımlık, 2. ara kullanımlık, 3. sürekli kullanımlık biyosensörler şeklinde sınıflandırılmaktadır [11].

Dönüştürücünün Algılama Tipine Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Algılama temel olarak fiziksel algılama ve kimyasal algılama şeklinde ikiye ayrılmaktadır.

Fiziksel Algılama

Fiziksel algılamada biyoreseptörün analit ile reaksiyona girmesiyle oluşan sinyal dönüştürücü tarafından potansiyometri, amperometri, termometri veya fotometri gibi fiziksel büyüklüklerin değişimine bağlı olarak elektrik sinyaline dönüştürülmektedir.

Potansiyometrik algılama: Potansiyometrik ölçüm analit içerisine daldırılmış, birisi referans elektrod, diğeri ise ölçüm

elektrodu olan iki elektrod arasındaki potansiyel farkın ölçülmesiyle gerçekleşmektedir. Referans elektrod bulunduğu çevreden bağımsız ve sabit bir gerilim değerine sahiptir. Ölçüm elektrodu ise katı ve sıvı ara yüzeyinde oluşan yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarına bağlı olarak ortaya çıkan gerilim değerine sahiptir. Potansiyometrik ölçümler değişik elektrodların kullanılmasıyla gerçekleştirilebilmektedir. Bunlara örnek olarak hidrojen iyonu (H^+) konsantrasyonunun ölçülmesinde kullanılan cam pH elektrodları verilebilir. Bu elektrodlar hidrofobik membranlar ile kaplanarak CO_2 veya NH_3 gibi gazların algılanmasında da kullanılabilir. Uygun bir şekilde değişime uğratılarak NH_4^+ , Li^+ , Na^+ ve K^+ gibi katyonlara karşı hassasiyet kazandırılan elektrodlar, enzimatik membranlar ile kaplanarak biyosensör olarak kullanılabilir [7].

Amperometrik algılama: Amperometrik ölçüm, sabit gerilim altında bulunan elektrokimyasal hücreden geçen akım yoğunluğunun ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Burada da referans elektrod ve ölçüm elektrodu şeklinde iki elektrod kullanılmaktadır. Yükseltgenme veya indirgenme reaksiyonu ölçüm elektrodu tarafından gerçekleştirilmektedir. Elektroliz süresince, analitin yapısına göre ölçüm elektrodu anot ya da katot olarak davranabilmektedir [7].

Termometrik algılama: Analit ile biyoreseptör arasında oluşan reaksiyonların entalpi değişimlerinin ölçüldüğü termometrik algılamada sıcaklığın ölçülmesi için optik, mekanik veya elektriksel metotlar kullanılabilir. Sıcaklık değişimiyle doğrusal olarak elektrik sinyali elde etmek mümkün olduğundan, termal biyosensörlerin oluşturulmasında elektriksel metot en kullanışlı yöntem olarak kabul görmektedir [7].

Piezoelektrik algılama: Piezoelektrik algılama piezoelektrik kristal yüzeyinde bulunan biyoreseptör ile analitin reaksiyona girmesi sonucu ortaya çıkan kütle artışına bağlı olarak, kristalin rezonans frekansındaki değişimin ölçülmesi temeline dayanır [7]. Kütle hassasiyetli algılama prensibine dayalı bu tip biyosensörlerde genel olarak kuvars (quartz) kristalli ankastre giriş (cantilever) kullanılmaktadır [12,13]. Bu tip aygıtların kullanılmasıyla kütledeki küçük değişimleri bile algılamak mümkün olabilmektedir. Bu alanda geliştirilen piezoelektrik temelli akustik dalga cihazları, kütle, yoğunluk, viskozite ve akustik kuvvet değişimlerine karşı duyarlıdır. Dolayısıyla rezonans frekans serileri hassas uyum parametresi olarak kullanılabilirler [14].

Fotometrik algılama: Optik fiberlerin kullanıldığı fotometrik algılama yönteminde biyoreseptörler optik fiberler üzerine yerleştirilmişlerdir. Analit ile biyoreseptör arasındaki etkileşim sonucu ortaya çıkan absorpsiyon veya ışımaya bağlı olarak ışık şiddetindeki değişimin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır [14].

Kimyasal Algılama

Bazı biyosensörler analitin içindeki yapıların teşhis edilmesinde dönüşüm reaksiyonlarını veya bağlanma reaksiyonlarını kullanmaktadırlar. Dönüşüm reaksiyonlarında biyoreseptör olarak kullanılan enzim analiz edilecek olan bileşeni dönüştürücü tarafından algılanabilecek bir ürüne dönüştürür. Buna örnek olarak penisilanz enziminin penisilini penisilolik asite dönüştürmesi verilebilir. Bu yapıda daha sonra ölçüm için pH elektrodu kullanılmaktadır.

Birleşme reaksiyonları ise antijen ve antikorlar arasındaki birleşme reaksiyonlarının temel alındığı özel bir algılama yöntemidir. Bu reaksiyonlar sonucunda ortaya çıkan elektriksel yükteki değişim, kütle veya optik özelliklerdeki değişim daha önce söz edilen dönüştürücü çeşitleri ile teşhis edilmektedir [7].

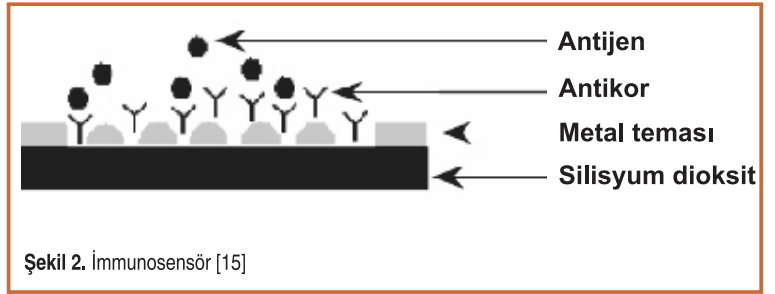
Kullanılan Biyoreseptör Tipine Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörlerin oluşturulabilmesi için analiz edilecek yapıya ve çalışma ortamına uygun biyoreseptörün seçilmesi gerekmektedir. Bu amaçla kullanılacak biyoreseptörler başlıca beş grup altında toplanmaktadır. Bunlar; 1. antikor/antijen, 2. enzimler, 3. nükleik asitler/DNA, 4. hücre yapılı yapılar/hücreler, 5. biomimetik [9].

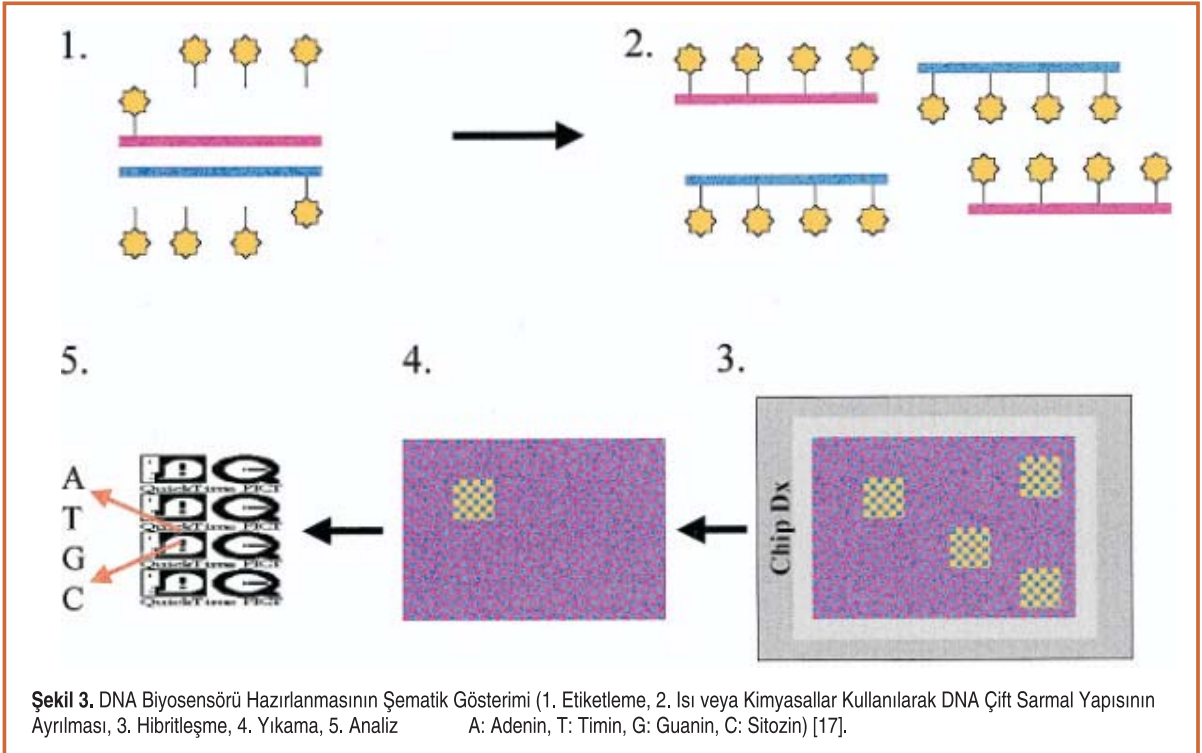
Antikor (antibody) biyoreseptörler: Antikorlar yüzlerce aminoasitin düzenli bir sırayla bağlanmasıyla oluşan, protein yapısında kompleks biyomoleküllerdir. Bu biyolojik moleküller özel

yapılara bağlanabilme kabiliyeti göstermektedir. Teşhis edilmek istenen bir antijenin reseptör olarak kullanılan bir antikora bağlanması anahtar kilit mekanizması şeklinde algılanabilir. Nasıl bir kilit kendine uyan bir anahtar ile açılabilir ise analit içerisindeki bir antijen de sadece kendi yapısına uygun olan bir antikora bağlanabilir. İşte bu özelliklerden faydalanılarak tasarlanan immuno (bağışıklık) sensörler (Şekil 2) ile özel analitlerin analiz edilmesi mümkün olmaktadır. Antikor biyoreseptörlerin kullanılması ile tasarlanan biyosensörlerde sağlanan son gelişmeler ve nano teknolojinin kullanılması ile tek bir hücre içerisinde ölçümler yapabilecek nanometre boyutunda fiber optik sensörler geliştirilmiştir [9].

Enzim biyoreseptörler: Enzimler sensör üzerine bağlanabilme yetenekleri kadar katalitik özellikleri ile de ön plana çıkan ve yaygın olarak kullanılan biyoreseptörlerdir. Biyokatalitik teşhis mekanizmasında algılama, biyokatalistin reaksiyonu katalize etmesi ile gerçekleşmektedir. Enzimler tarafından sağlanan katalitik etki biyosensörlerin daha düşük



Şekil 2. İmmunosensör [15]



Şekil 3. DNA Biyosensörü Hazırlanmasının Şematik Gösterimi (1. Etiketleme, 2. Isı veya Kimyasallar Kullanılarak DNA Çift Sarmal Yapısının Ayrılması, 3. Hibritleşme, 4. Yıkama, 5. Analiz A: Adenin, T: Timin, G: Guanin, C: Sitozin) [17].

limitler arasında ölçüm yapabilmelerini sağlar. Enzimlerin katalitik aktiviteleri ise doğal proteinlerin şekilsel bütünlüklerine bağlıdır [9].

Nükleik asit biyoreseptörler: Nükleik asit sensörleriyle DNA, RNA, bunların parçaları veya bunları taşıyan moleküllerin analizi yapılabilmektedir. Gen analizlerinde kullanılan DNA biyosensörleri DNA'nın yapısında bulunan bazların (adenin=timin, guanin≡ sitozin) birbirlerini tamamlayıcı özelliklerine [9] ve tersinir hibridizasyon/dehibridizasyon mekanizmasına göre geliştirilmişlerdir [16]. Eğer DNA molekülünün belirli bir kısmını oluşturan baz dizisi biliniyor ise bu durumda bu diziyi tamamlayacak olan ve prob olarak adlandırılan karşı dizi sentezlenebilmekte ve optik olarak teşhis edilebilen bir bileşik ile etiketlenebilmektedir. DNA çift sarmal yapısı etiketleme işleminden sonra ısı veya kimyasalların etkisiyle ayrılarak prob üzerine yerleştirilmektedir. Ardından analit içerisinde yerleştirilen prob hedef moleküller ile hibritleşme reaksiyonuna girerek çiftli sarmal yapıyı oluşturmaktadır. Daha sonra optik mikroskop veya ışınma yoluyla yapı analiz edilmektedir [17].

Hücre sel biyoreseptörler: Hücre sel yapılar ve hücreler biyosensörlerin gelişiminde oldukça etkili bileşenler olmuşlardır. Bu tür reseptörlerin elektrod üzerine bağlanmaları oldukça kolaydır. Bir hücrenin, mikroorganizmanın veya özel bir hücre sel bileşenin teşhis edilmesinde oldukça etkin olan bu reseptörler hücre sel sistemler, enzimler ve enzimatik olmayan proteinler olmak üzere başlıca üç alt gruba ayrılırlar. Bu tür reseptörlerin kullanımı sinyal amplifikasyonuna bağlı olarak ölçüm limitlerini daraltmaktadır. Hücre organelleri kapalı sistemler olduklarından uzun süre kullanılabilme avantajı sağlamaktadırlar. Bütün memeli hayvanların dokuları, in vitro kültüründe elde edilmiş memeli hayvan hücreleri ve bitkisel dokular biyoreseptör olarak kullanılabilirler [9].

Biyomimetik reseptörler: Biyoreseptörlerin örnek alınmasıyla yapay olarak üretilen biyomimetik reseptörler genetik olarak işlenmiş moleküller, yapay membranların üretimi ve moleküler baskılama yöntemleri ile elde edilmektedirler [9]. Moleküler baskılama; bir kalıp molekülü etrafında fonksiyonel monomerlerin kovalent veya kovalent olmayan etkileşimlerle düzenlenerek kimyasal fonksiyona sahip katı malzemelerin oluşturulması şeklinde ifade edilmektedir [18]. Moleküler baskılama tekniğinin en büyük avantajlarından bir tanesi polimer yapısının biyolojik reseptörle kıyaslandığında çok daha sağlam ve dayanıklı olmasıdır. Bu nedenle biyomimetik reseptörler özellikle biyoreseptörlerinin kullanımının uygun olmadığı ortamlarda tercih edilmektedirler. Buna karşın polimerik moleküllerin rijit yapılarından dolayı esneklik ve seçicilik özellikleri biyomoleküllere nazaran daha zayıftır [9].

Biyosensörlerin Kullanım Durumuna Göre Sınıflandırılması

Biyosensörler tek kullanımlık, ara kullanımlık ve sürekli kullanımlık olmak üzere üç şekilde sınıflandırılabilirler.

Tek kullanımlık biyosensörler

Bu tip biyosensörlerde elektrokimyasal veya optik hücre içerisinde bir seçici eleman ve bir de dönüştürücü bulunmaktadır. Ölçüm işlemi numune çözeltisi ile reseptör arasında reaksiyon başladıktan birkaç saniye sonra kronoamperometrik olarak gerçekleşmektedir. Tüm proses 60 saniyeden daha kısa bir süre içerisinde gerçekleşmektedir. Bu tip biyosensörlerin doğruluğu ve kesinliği oldukça zayıftır. Ayrıca elde edilecek veri başına maliyet de son derece yüksektir. Kolay kalibre edilememelerine rağmen bu tip sensörler kandaki glukoz miktarının ölçülmesinde kullanılmaktadırlar.

Ara kullanımlık sensörler

Genellikle akış olan ortamlarda kullanılmaktadırlar. Ölçüm sonuçlarında mükemmel doğruluk ve kesinlik sağlamakla birlikte, düşük konsantrasyonlarda bile hassasiyetleri oldukça yüksektir (nM mertebesinde ölçüm yapılabilir). Kullanım ömrü oldukça uzun olan bu tip biyosensörlerin maliyetleri de daha düşük olmaktadır. Optik ve elektrokimyasal kısımların kalibrasyonu kolaydır. Portatif olmayan ara kullanımlık biyosensörler laboratuvara bağımlı sensörlerdir. Bu durumda analiz edilecek numunenin sensörün bulunduğu ortama taşınması gerekmektedir. Bu tip sensörlerin yonga-üzerinde-laboratuvar (lab-on-a chip) uygulamalarında kullanılması yönünde çalışmalar devam etmektedir.

Sürekli kullanımlık sensörler

Özellikle canlı dokulardaki uygulamalarda en az etkin olan sensör çeşididir. Algılama limitleri oldukça düşüktür. Pek çok durumda doğruluk ve kesinlikleri kontrol edilememekte, verdikleri cevaplar ise tam olarak anlaşılabilir değildir. Yapıları oldukça basit olan bu sensör grubunun maliyetleri de oldukça düşüktür [11].

BIYOSENSÖRLERİN İMALATI

Biyosensörlerin imalatında ilk olarak biyoreseptör seçimi yapılmakta daha sonra uygun dönüştürücü belirlenmekte ve son olarak da biyolojik bileşenin dönüştürücü üzerine sabitlenmesi ile işlem tamamlanmaktadır.

Biyoreseptör seçimi

Biyoreseptörler moleküler algılayıcı olarak görev yapmaktadırlar. Analiz edilecek olan analit çözeltisi ile reaksiyona girerek, dönüştürücünün algılayabileceği fizikokimyasal bir etki oluşturmaktadırlar. Bu nedenle analiz edilecek moleküle uygun olarak biyosensör seçimi yapılmalıdır [7].

Biyoreseptör olarak kullanılan enzimler genellikle ticari olarak kolayca ulaşılabilen enzimlerdir. Bunlara örnek olarak glukozoksidaz ve üreaz enzimleri verilebilir. Enzimler çok özel uygulamalar için bir veya daha fazla biyolojik kaynaktan da temin edilebilmektedirler. Tek başlarına kullanılabilirlikleri gibi NAD ve NADP gibi kofaktörleri ile de kullanılabilirler. Özellikle kompleks reaksiyonların oluşumunun inceleneceği durumlarda biyoreseptör olarak mikroorganizmaların veya hücrelerin seçilmesi daha uygun olmaktadır. Bu yapısal elemanlar gerekli olan bütün enzim ve kofaktörleri içermekte ve uygun kültür oluşturulduğunda tekrar üretilerek enzimatik reaksiyonlardaki kayıpları telafi edebilmektedirler.

Bir diğer biyoreseptör çeşidi olan doku ve organellerin kullanılması ise dönüştürücü üzerine kolay sabitlenebilmeleri ve sağlam yapılarıyla avantaj sağlamaktadır [7].

Dönüştürücü Seçimi

Bir analiz işleminde analit ile biyoreseptör arasında reaksiyon oluşup oluşmadığını gösteren eleman olan dönüştürücü, oluşan reaksiyonun tipine göre seçilmelidir. Bunun yanında dönüştürücü seçiminde dikkat edilmesi gereken bir diğer önemli husus biyosensörün kullanılacağı ortamdır. Örneğin in vivo uygulamalarında kullanılacak olan bir biyosensörün biyoyumluluk özelliğini sağlaması gerekmektedir. Bu tip sensörler daha çok vücuda implante edilerek kullanıldıklarından küçük boyutlarda olmaları ve yüzey biçimlerinin canlı dokulara zarar vermeyecek şekilde uyarlanmış olması gerekmektedir. Özellikle uzun süreli uygulamalarda toksik, metalik veya polimerik bileşenlerin ortaya çıkabilme ihtimali de göz önünde bulundurulmalıdır [7].

Biyoreseptörlerin İmmobilizasyonu

Biyosensörlerin oluşturulmasında en çok sıkıntı yaşanan aşama biyoreseptörlerin dönüştürücü üzerinde immobilizasyonudur [19]. Biyoreseptörlerin analit ile temasının en üst düzeyde sağlanabilmesi ve buna bağlı olarak alınacak ölçümlerin sağlıklı olabilmesi için biyolojik açıdan aktif olan moleküllerin dönüştürücü üzerine immobilize edilmesi gerekmektedir. Hayvansal ve bitkisel dokular membran yapısına sahip olduklarından bu kuralın dışında kalmaktadırlar [7].

Reseptörlerin dönüştürücüler üzerinde immobilizasyonu polimer jel matriste tutuklama, yarı geçirgen kapsül içerisinde mikrokapsülleme, polimer yüzeyine fiziksel adsorpsiyon gibi fiziksel yöntemler ile gerçekleştirilebildiği gibi, kovalent bağlama, iki veya çok fonksiyonlu reaktifler ile çapraz bağlama ve kimyasal adsorpsiyon gibi kimyasal yöntemler ile de sağlanabilmektedir [8, 20].

Enzimler yüksek moleküler ağırlıklı, yeterince büyük boyutlu proteinler olduklarından poliakrilamid jeli içerisinde fiziksel olarak kolaylıkla tutunabilmektedirler. Bunun yanında

enzimleri protein difüzyonunu önleyen diyaliz membranlar kullanarak elektrod üzerinde sabitlemek mümkündür. Fiziksel sabitleme enzimlerin uzun süre çözelti içerisinde kalmasını gerektirdiğinden enzimlerin aktivitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle günümüzde daha çok kimyasal sabitleme kullanılmaktadır. Kimyasal sabitleme yöntemlerinden kovalent veya çapraz bağlar enzimlerin uzun süre kararlı kalmalarını sağladıklarından daha yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bu amaçla kullanılan teknikler başlıca daldırma yöntemi, aerosol kullanımı ve membran kullanımı şeklinde sıralanabilir [7].

Daldırma yöntemi

Bu yöntemde elektrod ilk olarak enzim, albümin ve çapraz bağlayıcı ajanların bulunduğu çözeltinin içine daldırılır. Yüzeyi kaplanan elektrod eksenine etrafında döndürülerek homojen bir enzim tabakanın oluşması sağlanır. Daha sonra elektrod glisin çözeltisine daldırılarak fazla çapraz bağlayıcı ajanlardan arındırılır. Bu metot kolaydır ve pek çok dönüştürücü için kullanılabilir. Özellikle küçük dönüştürücülerde tercih edilmektedir.

Aerosol kullanımı

Biyosensörlerin cevaplama zamanı aktif tabakanın kalınlığı ile yakından ilişkilidir. Çözülmüş bileşiklerin aerosol buharlaştırma yöntemi ile biriktirilmesi oldukça ince ve homojen tabakaların elde edilmesine olanak tanımaktadır. Elektrodun hassas ucu yıkandıktan sonra enzim tabakasının içine daldırılarak 20 dakika bekletilir. Daha sonra 4 °C'de kurutulan elektrod üzerindeki hassas bölgeye glutaraldehit buharlaştırılır. Çapraz bağlamadan sonra elektrod saf su ile yıkanır. Bu yöntem ile elde edilen film kalınlıkları 1-2 µm'dir. Biyosensörün cevaplama zamanı ise 5-10 saniye arasında değişmektedir [7].

Membran kullanımı

Biyolojik moleküllerin yaşam süreleri sınırlı olduğundan değiştirilebilir biyoreseptörlerin kullanımı daha uygun olmaktadır. Bu yöntemde enzim membran üzerine sabitlenmekte, membran ise transdüser üzerine eklenmektedir. Bu durum hem kitlesel üretime hem de biyosensör sinyalinin tekrar üretilebilirliğine olanak sağlamaktadır [7].

BIYOSENSÖR UYGULAMALARI VE BU ALANDAKİ GELİŞMELER

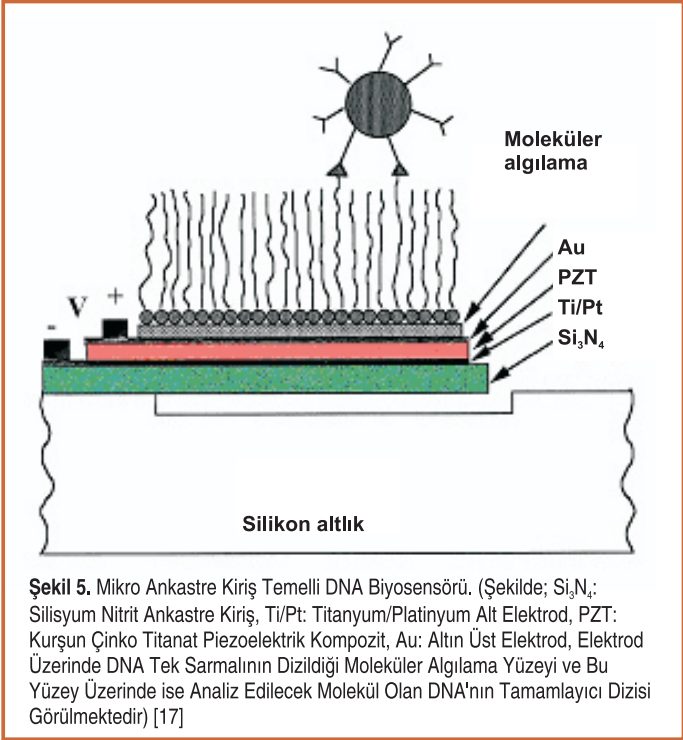
Biyomedikal alanda son derece geniş kullanım alanına sahip olan biyosensörler özellikle diyabetik uygulamalarda kandaki glukoz miktarının ölçülmesinde, gen analizlerinde[21] kronik kalp hastaları için kalp ritimlerinin düzenlenmesinde (pacemaker) [22], alerjik reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan antikorların analiz edilmesinde[21], hasar görmüş bir doku veya kemiğin onarılmasında, metabolik ürünlerin izlenmesinde ve diyaliz tedavisi gören hastaların takip edilmesinde kullanılmaktadırlar [8]. Bunların yanında Şekil

4'te görüldüğü gibi, in vivo basınç sensörlerinin, implante edilebilir mikroelektrod dizilerinin, ilaç salım sistemlerinin, biyokimyasal sensörlerin vb. içinde bulunduğu sistemler geliştirilmiştir. Bu sistemler yonga-üzerinde-laboratuvar teknolojisi (lab-on-a-chip) olarak adlandırılmaktadır [23].

Biyomedikal uygulamalarda kullanılan glukoz, laktat, kolesterol, üre, kreatin biyosensörleri amperometrik enzim bazlı biyosensörlerdir. Bunlar “off line”, “in vivo” ve “on line” olmak üzere üç değişik şekilde kullanılabilirler. Off line dedektörler ölçüm yapılacak olan ortama (insan vücudu veya biyolojik preparat) enjekte edilmek suretiyle analitin ilgili konsantrasyonunu belirlemektedir. Ticari olarak kullanılmakta olan glukoz biyosensörleri bu sınıfa dâhil edilmektedir. In vivo uygulamalarında biyosensör vücuda implante edilmekte ve sürekli olarak incelenen analitin ilgili konsantrasyonu okunmaktadır. On line uygulamalarda ise biyosensör vücutta bulunan numune alma elemanından gelen bir akış hattına bağlanmıştır. Bu tip deneysel düzeneklerde genellikle vücuda implante edilmiş bir mikrodiyaliz grubu bulunmakta ve incelenecek olan analitin biyosensöre doğru akışı sağlanmaktadır [4].

Gen analizlerinde kullanılan DNA biyosensörleri DNA-ilaç etkileşimlerinin, bulaşıcı ve kalıtsal hastalıkların tayini gibi klinik araştırmalarda, çevresel ve adli tıp araştırmalarında oldukça önemli verilerin elde edilmesine olanak sağlamaktadır [13].

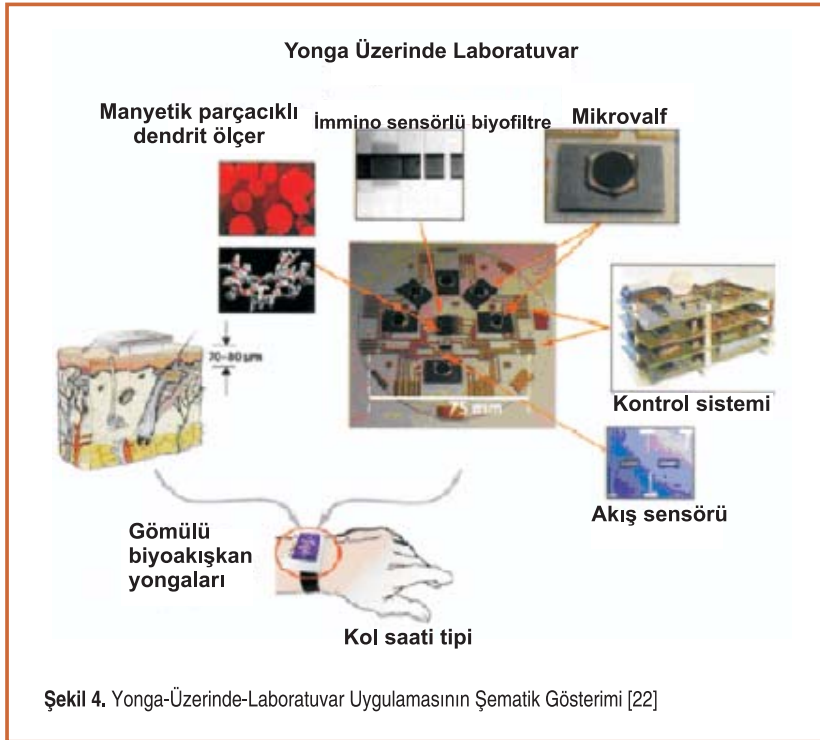
Sensör teknolojisindeki ilerlemeler mikro veya nano



Şekil 5. Mikro Ankastr Kiriş Temelli DNA Biyosensörü. (Şekilde; Si₃N₄: Silisyum Nitrit Ankastr Kiriş, Ti/Pt: Titanyum/Platinyum Alt Elektrod, PZT: Kurşun Çinko Titanat Piezoelektrik Kompozit, Au: Altın Üst Elektrod, Elektrod Üzerinde DNA Tek Sarmalının Dizildiği Moleküler Algılama Yüzeyi ve Bu Yüzey Üzerinde ise Analiz Edilecek Molekül Olan DNA'nın Tamamlayıcı Dizisi Görülmektedir) [17]

boyutlardaki sistemlerin üretimi yönünde hızla ilerleme kaydetmektedir. Mikro ve nano elektromekanik sistem (MEMS/NEMS) teknolojilerinin biyosensörlere uygulanması ile ortaya çıkan bio-mikro/bio-nano elektro mekanik sistemler (BioMEMS/BioNEMS) özellikle in vivo uygulamalarda son derece hassas ölçümlerin yapılabildiği sensör sistemlerinin oluşturulmasına olanak tanımaktadır. Biyosensörlerin imalatında nanomalzemelerin kullanılması ile sensörlerin hassasiyet, cevaplama hızı, ölçüm aralığı vb. karakteristik özelliklerinde önemli derecede artış sağlanmaktadır [24].

McGlennen ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada piezoelektrik ince filmin mikro işlenmiş ankastr kirişte kullanılması ile DNA hibridizasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan kütle değişiminin ölçülmesini amaçlamışlardır. Şekil 5'te görülen mikro ölçekli DNA biyosensöründe elektrod üzerine yerleştirilmiş olan DNA'nın tek sarmalı moleküler algılayıcı olarak görev yapmaktadır. Si₃N₄ ankastr kiriş üzerine yerleştirilmiş olan piezoelektrik kurşun çinko titanatın (PZT) hibritleşme sonucunda oluşan kütle değişimine bağlı olarak salınım frekansında değişiklik ortaya çıkmaktadır. Bu değişim sonucunda oluşan gerilim farklılıklarının ölçülmesiyle ölçüm işlemi gerçekleştirilmektedir [17].



Şekil 4. Yonga-Üzerinde-Laboratuvar Uygulamasının Şematik Gösterimi [22]

SONUÇ

Yapılan bu çalışmada medikal uygulamalarda kullanılan biyosensörler tanımlanmış, genel çalışma prensipleri ve metrolojik karakteristikleri üzerinde durulmuştur. Literatürde karşılaşılan değişik sınıflandırmalara yer verilmiş, tasarım ve imalatla kullanılan malzeme ve teknikler hakkında literatür derlemesi yapılmıştır. Bunun yanında biyosensörlerin medikal alandaki uygulama örnekleri üzerinde durulmuş ve bu alanda özellikle mikro ve nano ölçekli sistemlerin geliştirilmesi yönünde yapılan çalışmalara değinilmiştir.

Mikro ve nano elektromekanik sistem (MEMS/NEMS) teknolojilerinin biyosensörlere uygulanması ile ortaya çıkan bio-mikro/bio-nano elektromekanik sistemlerin (BioMEMS/BioNEMS) kullanılması ile özellikle vücut içindeki uygulamalarda son derece hassas ölçümlerin yapılabilirdiği ifade edilmiştir. Minyatürleşmeye doğru gidilen uygulamalarda, biyosensörlerin imalatında nanomalzemelerin kullanılması ile sensörlerin hassasiyet, cevaplama hızı, ölçüm aralığı vb. karakteristik özelliklerinde önemli derecede artış sağlandığı literatür çalışmaları referans gösterilerek vurgulanmıştır.

KAYNAKÇA

1. Zhang, S., Wright, G., Yang, Y. 2000. "Materials and Techniques For Electrochemical Biosensor Design and Construction", *Biosensors & Bioelectronics*, 15, 273-282.
2. Blum, L.J., Coulet, P.R. 1991. *Biosensor Principles and Applications*, CRC Press; 1 Edition.
3. Thévenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S. 2001. "Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification", *Biosensors & Bioelectronics*, 16, 121-131,
4. Castillo, J., Gáspár, S., Leth, S., Niculescu, M., Mortari, A., Bontidean, I., Soukharev, V., Dorneanu, S.A., Ryabov, A.D., Csöregi, E. 2004. "Biosensors for Life Quality Design, Development and Applications", *Sensors and Actuators B*, 102, 179-194.
5. Deisingh, A.K., Thompson, M. 2004. "Biosensors For the Detection of Bacteria", *Can. J. Microbiol.* 50: 69.77.
6. Aykut, U., Temiz, H., 2006. "Biyosensörler ve Gıdalarda Kullanımı", *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3, 51-59.
7. Eggins, B.R. 1996. "Biosensors:an Introduction", Chichester: Wiley-Teubner, c.
8. Schwartz, M. 2002. *Encyclopedia of smart materials*, vol..1,2, John Wiley and Sons, Inc., New York, A.B.D.
9. Ferrari, M., Bashir, R., and Wereley, S. 2007. *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology*, Springer US.
10. Martin, J. E. 2001. *Composite Films for Modifying Evanescent Wavv Characteristics in Long Period Grating Biosensors*, Master Thesis, Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University.
11. Kissinger, P.T. 2005. "Biosensorsa perspective", *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2512-2516.
12. Luong, J.H.T., Male, K.B., Glennon, J.D. 2008. "Biosensor technology: Technology push versus market pull", *Biotechnology Advances*, 26, 492-500.
13. Ziegler, C., Göpel, W. 1998. "Biosensor development", *Current Opinion in Chemical Biology*, 2:585-591.
14. Deisingh, A. K., Thompson, M. 2004. "Biosensors for the detection of bacteria", *Can. J. Microbiol.* 50: 69.77.
15. Jianrong, C. Yuqing, M. Nongyue, H., Xiaohua, W., Sijiao, L. 2004. "Nanotechnology and biosensors", *Biotechnology Advances*, 22, 505-518.
16. Placko, D. 2007. "Fundamentals of Instrumentation and Measurement", ISTE Ltd.
17. McGlennen, R.C. 2001. "Miniaturization Technologies for Molecular Diagnostics", *Clinical Chemistry* 47:3 393-402.
18. <http://www.molecular-imprinting.org/story/What.htm>
19. Ratner, B. D., Hoffman, A.S., Schoen, F. J., Lemons, J. E. 1996. *Biomaterials Science*, U.S.A..
20. Sharma, S. K., Sehgal, N., Kumar, A. 2003. "Biomolecules For Development of Biosensor and Their Applications", *Current Applied Physics*, Volume 3, Issues 2-3, Pages 307-316.
21. Nordström, M. 2007. *Biosensors and BioMEMS*, Bioprobes Group MIC - Department of Micro and Nanotechnology, Technical University of Denmark. <http://www.innovationlab.net/sw8745.asp>
22. Bhushan, B. 2007. "Nanotribology and nanomechanics of MEMS/NEMS and BioMEMS/BioNEMS Materials and Devices", *Microelectronic Engineering*, 84, 387-412.
23. Okandan, M., Galambos, P., Mani, S., Jakubczak, J. *Development of Surface Micromachining Technologies for Microfluidics and BioMEMS*, Sandia National Laboratories, P.O. Box 5800 MS 1080 Albuquerque, NM 87185 USA
24. Jianrong, C. Yuqing, M., Nongyue, H., Xiaohua, W., Sijiao, L. 2004. "Nanotechnology and biosensors", *Biotechnology Advances*, 22, 505-518.