

Paulina Cynk, Ewelina Gawęł

Zastosowanie biosensorów w diagnostyce choroby nowotworowej

The application of biosensors in tumor diagnostics

Koło Naukowe "Bio-Tech"
Zamiejscowy Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego

STRESZCZENIE

Według raportu WHO, nowotwory są jedną z głównych przyczyn śmiertelności na świecie i odpowiadają za około 13% wszystkich zgonów (z 7,6 milionów zgonów) [1]. Jednym z powodów jest późna wykrywalność choroby nowotworowej. Obecnie wydaje się, że dobrym rozwiązaniem tego problemu, mogą być biosensory. Są to urządzenia składające się z dwóch podstawowych elementów: biologicznego, reagującego z badaną substancją oraz analitycznego, generującego i przetwarzającego sygnał. W tym opracowaniu omówiono najpopularniejsze rodzaje biosensorów i metodykę ich działania. Wskazano także przykłady zastosowania biosensorów, skupiając się na perspektywach ich wykorzystania w diagnostyce choroby nowotworowej.

Słowa kluczowe: biosensory, nanotechnologia, nowotwory, diagnostyka.

ABSTRACT

According to WHO report, cancer is one of the leading reasons of human death worldwide, accounting for around 13% of all deaths (7,6 million all deaths)[1]. One of the causes is late diagnosis of cancer. Recently, biosensors seem to be a good solution to help solve that problem. Biosensors are devices consisting of two components: a biological one, which reacts with analyzed substance, and an analytical component, which generates and transduces the signal. The paper is discussing about the most popular biosensor types and the way they work. It also shows examples of use, with impact on perspectives concerning cancer diagnosis.

Key words: biosensing techniques, nanotechnology, neoplasms, diagnostics.

1. Wprowadzenie

Historia biosensorów rozpoczęła się w 1956 r., gdy Leland C. Clark Jr., nazywany „ojcem biosensorów”, wynalazł pierwszy sensor – elektrodę tlenową. W 1962 r. Clark opisał pierwszy amperometryczny biosensor, którym była elektroda enzymatyczna dla glukozy [2, 3, 4]. Od tego czasu biosensory stały się przedmiotem intensywnych badań, pobudzających zainteresowanie i wyobraźnię naukowców [5]. W latach 1972–1975 po raz pierwszy wprowadzono na skalę komercyjną biosensor, nazwany Yellow Springs Instruments, który służył do oznaczania glukozy [3, 4]. Sprzedaż detaliczna biosensorów dla pojedynczego analitu odniosła sukces [3, 4, 6], co

przyczyniło się do ogromnej popularności biosensorów w ostatnich kilkunastu latach [6]. Rozwój techniki umożliwił konstruowanie coraz to doskonalszych i bardziej zaawansowanych technologicznie urządzeń (m.in. od makro- do mikro- i nanorozmiarów) [7, 8].

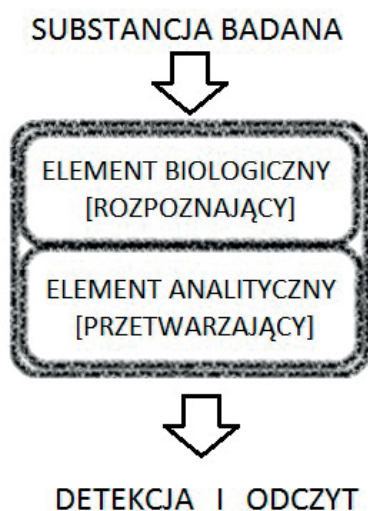
Biosensor jest definiowany jako urządzenie służące do wykrywania biologicznego analitu występującego w środowisku lub pochodzenia biologicznego (np. występującego w ludzkim ciele) [7, 9]. Według IUPAC (ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*) jest to samowystarczalne zintegrowane urządzenie, które jest w stanie zapewnić konkretne, ilościowe lub półilościowe, informacje analityczne za pomocą rozpoznawanego

elementu biologicznego (biochemiczny receptor), który pozostaje w bezpośrednim kontakcie przestrzennym z elektrochemicznym elementem przewodzącym [10]. W zależności od obszaru zastosowania biosensory mogą mieć różną definicję i terminologię (np. immunosensory, glukometry, biochipy, biokomputery, itp.) [2].

2. Budowa i ogólne zasady działania

W skład budowy biosensora wchodzi kilka podstawowych elementów (w zależności od autora, przetwornik i detektor mogą być uznawane za pojedynczy element) [3, 7, 9, 11, 12] i są to:

- Rozpoznający element czuły. We wczesnych biosensorych elementy biologiczne były izolowane od żywych systemów. Wraz z postępem w technologii i chemii syntetycznej, wiele elementów czułych w biosensorych jest dziś syntetyzowanych w laboratorium, w celu umożliwienia lepszej stabilności i powtarzalności działania [7, 9].
- Transducer (przetwornik) sygnału [3].
- Detektor – odbiera sygnały z przetwornika. Dane są wzmacniane i analizowane, a następnie przekształcane do jednostek stężenia oraz wyświetlane i/lub przechowywane [3, 12]).



Ryc. 1. Schemat budowy biosensora, zmodyfikowane [wg 7]
Fig. 1. Schematic representation of a biosensor, modified [wg 7]

3. Klasyfikacja biosensorów

Podstawą klasyfikacji biosensorów jest rodzaj elementu rozpoznającego i transduktora [13, 14, 15]. W przypadku zastosowania rodzaju elementu czułego jako podstawy do klasyfikacji, biosensory dzieli się na [8, 10, 16, 17, 18]:

- enzymy (pojedyncze lub kilka enzymów),
- całe komórki (mikroorganizmy, grzyby, komórki eukariotyczne),
- organelle komórkowe (np. części mitochondriów, ściany komórkowej),

- receptory komórkowe,
- antygeny i przeciwciała,
- kwasy nukleinowe,
- inne komponenty biologiczne lub metaboliczne (np. glukoza).

Jeżeli bierze się pod uwagę typ monitorowania reakcji, wyróżnić można biosensory, które pozwalają na [10]:

- bezpośrednie monitorowanie stężenia analitu w reakcji syntezy lub rozkładu danego analitu oraz
- pośrednie monitorowanie przy udziale inhibitora lub aktywatora rozpoznawalnego elementu czułego (biochemiczne receptory).

Ze względu na rodzaj przetwornika wyróżnia się biosensory [9, 10, 17, 19, 20]:

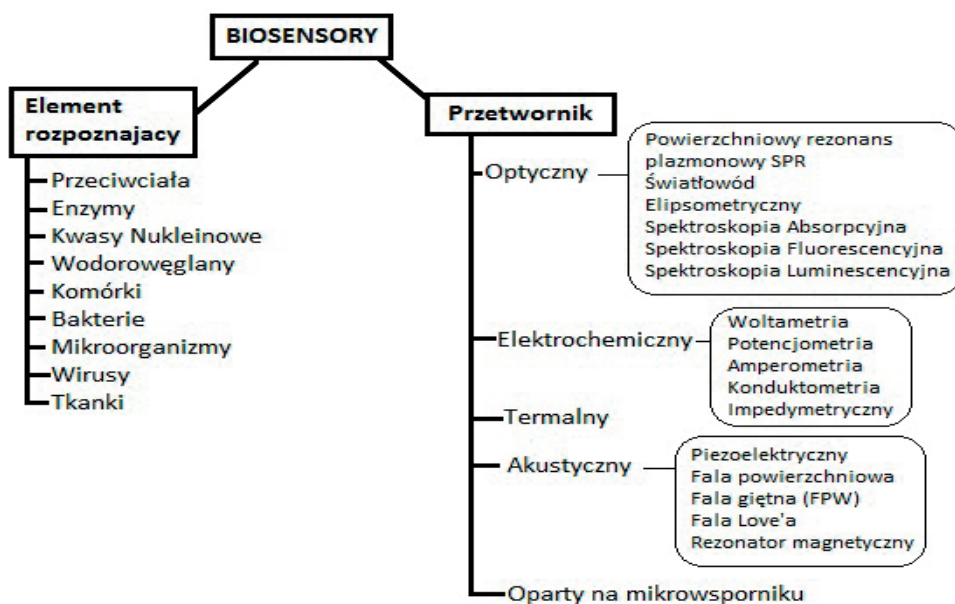
- elektrochemiczne (wykorzystujące potencjometryczne, amperometryczne lub impedymetryczne przetworniki do przekształcania informacji biologicznej w mierzalny sygnał),
- optyczne,
- akustyczne falowe,
- termiczne (cieplne),
- oparte na mikrowspornikach.

4. Zastosowanie biosensorów

Głównymi wymaganiami stawianymi biosensorym jest, aby były wartościowe pod względem badań naukowych i aplikacji komercyjnych [16]. Biosensory odgrywają ważną rolę w medycynie, przemyśle czy ochronie środowiska, zapewniając rutynowe analizy oraz wczesne wykrywanie problemów i punktów kryzysowych [3]. W ochronie środowiska biosensory są stosowane do wykrywania szkodliwych bakterii i pestycydów w powietrzu, wodzie lub żywności [7, 9, 21, 22]. Służą badaniu zawartości metali, alkanów, surfaktantów, hormonów [9, 21]. Biosensory znajdują również zastosowanie w analizie żywności oraz działaniach wojskowych [8, 9].

Z technicznego punktu widzenia, do możliwości biosensorów zalicza się [23]:

- analizę interakcji antygen-przeciwciała,
 - uzyskanie dokładnych informacji na temat kinetyki i stałej równowagi reakcji antygen – przeciwciała,
 - badania nad analitami biwalentnymi,
 - ogólną analizę reakcji białko-białko, ligand-receptor, ale też reakcji peptydów, kwasów nukleinowych, lipidy-białko, białko-komórka, proces fałdowania białka,
 - screening małych cząsteczek, np. leków celowanych, wirusów, części fagów i komórek,
 - wzajemny wpływ cząsteczek różnych leków (głównie biosensory SPR),
 - analizę niszczącej powierzchni: analit z danej powierzchni oddysocjowuje od niej i tworzy kompleks z receptorem (biosensorem SPR),
 - tworzenie leków jednocześnie hydro- i lipofilnych.
- Natomiast w samej medycynie biosensory są wykorzystywane do [3, 9]:



Ryc. 2 Klasyfikacja biosensorów w zależności od elementu rozpoznającego i przetwarzającego, zmodyfikowane [wg 19]
Fig. 2 The classification of biosensors according to recognition parts and transducers, modified [wg 19]

- monitorowania poziomu glukozy we krwi u diabe-tyków,
- wykrywania, identyfikacji i kwantyfikacji bakteryj-nych patogenów,
- diagnozowania i monitorowania wielu chorób, w tym raka,
- oceny aktywności biologicznej nowych związków (leków),
- określania występowania antybiotyków w żywności.

4.1. Zastosowanie biosensorów w diagnostyce onkologicznej

Z roku na rok rośnie liczba zdiagnozowanych przypadków zachorowań na raka, jednak nadal jest on drugą najczęstszą przyczyną śmiertelności wśród ludzi. Jednym z czynników odpowiadających za ten stan jest z całą pewnością zbyt późne wykrycie choroby nowotworowej. Wczesna diagnoza ma kluczowe znaczenie we wszystkich typach nowotworów i jest podstawą podniesienia przeżywalności pacjentów, zwiększenia rokowania w leczeniu oraz zapobiegania występowaniu raka [24]. Konieczne wydaje się opracowanie czułych i specyficznych metod pozwalających na wczesne rozpoznanie ogniska nowotworu. W stosunku do metod standardowych, biosensory wyróżnia kilka podstawowych zalet. Przede wszystkim badanie jest prowadzone w czasie rzeczywistym, łatwo je dopasować do konkretnej sytuacji i stanu pacjenta. Jest szybkie, pozwala na analizę kilku substancji jednocześnie, przy niższych kosztach końcowych i pełnej automatyzacji. Badania przesiewowe z wykorzystaniem biosensorów są skutecznym sposobem poprawienia wykrywalności raka, zarówno w systemie społecznej opieki zdrowotnej, jak również wśród krajów słabo rozwiniętych [3, 25].

W diagnostyce często stosowane są aptasensory (łac. *aptus* – dopasowany) wykorzystujące jako element czuły aptamery. Aptamery są sztucznymi oligonukleotydami, np. fragmentami DNA lub RNA, które odznaczają się wyjątkową selektywnością i specyficznością. Użycie ich do wykrywania markerów w diagnostyce wielu chorób, zwłaszcza nowotworowych, budzi wiele nadziei. Aptamery mają wiele zalet, w tym możliwość immobilizacji, czy modyfikacji w celu przyłączenia cząsteczek reporterowych bez wpływu na ich powinowactwo [24, 26].

Wykrywanie i identyfikacja komórek nowotworowych polega na identyfikacji niektórych znaczników, które pojawiają się tylko w komórkach nowotworowych, takich jak komórki chłoniaka (Ramos), czy komórki białaczki. Identyfikacja tych markerów nowotworowych wymaga specyficznych sond potrzebnych do znalezienia potencjalnego czynnika ryzyka. Różnorodne markery nowotworowe mogą znajdować się w komórkach krwi, białkach osocza lub wolnym DNA. Według ostatnich doniesień, to właśnie aptamery są z powodzeniem stosowane w celu zlokalizowania markerów nowotworowych [24]. Aptasensory mogą służyć także do wykrywania mikroorganizmów i wirusów, co ma kluczowe znaczenie dla ochrony zdrowia publicznego [24].

Nowe strategie pozwalają na szybką, tanią i niezawodną diagnostykę onkologiczną. Postęp w dziedzinie nanotechnologii przyczynił się do zainteresowania nanobiosensorymi [3]. Technologia wykorzystująca nanobiosensory daje nowe możliwości dostępu do komórek nowotworowych w procesach molekularnych. Nanobiosensory prezentują znaczny potencjał we wczesnym ostrzeganiu i wykrywaniu czynników nowotworowych,

czynników chemicznych i biologicznych oraz środków niebezpiecznych i czynników chorobotwórczych [3].

Tak szeroki wachlarz zastosowań biosensorów kieruje nadzieje badaczy głównie w stronę badań przyłóżkowych (ang. *point of care testing*), czyli prowadzonych wszędzie tam, gdzie znajduje się pacjent (zarówno na łóżku szpitalnym, jak i w miejscu trudno dostępnym lub znacznie oddalonym od placówek laboratoryjnych). Można mnożyć przykłady sytuacji, gdy szybka diagnoza oceniająca czy pacjent ma nowotwór jest kluczowa dla dalszego leczenia lub nawet życia pacjenta. Jednym z głównych czynników dających biosensorom przewagę nad jakimkolwiek innym rozwiązaniem diagnostycznym, jest ich niewielki rozmiar i możliwość przetransportowania „w kieszeni” w dowolne miejsce. Naturalnie, wiąże się to z nowymi wymaganiami stawianymi biosensorom, jak np. odtwarzalność, wielozadaniowość, ułatwienie przygotowania próbki, zwiększona specyficzność, możliwość ponownego użycia [3, 27, 28].

4.2. Przykłady aplikacji biosensorów

Szczególnym zainteresowaniem w konstrukcji biosensorów cieszą się nowe nanomateriały. Wyjątkowo duży potencjał prezentuje zastosowanie grafenu w biosensorach z tranzystorem polowym (ang. *field effect transistor* FET). Grafen, w porównaniu z innymi nanomateriałami, wykazuje większą przewodność elektryczną 2D, elastyczność, stabilność chemiczną i termiczną oraz możliwość pokrycia nim dużych powierzchni. Opracowano biosensor oparty na złotej elektrodzie, pokryty nanocząsteczkami krzemu, które zostały opłaszczane tlenkiem grafenu. Poszczególne warstwy zostały odpowiednio zbiofunkcjonalizowane i naładowane, a całość zoptymalizowana do pracy w warunkach fizjologicznych. Dopiero takie przygotowanie nanocząsteczek (ze zredukowanym tlenkiem grafenu) pozwala na przyłączenie (konjugację) do biosensora przeciwciała monoklonalnego. Myung i in. [2011] przekonują, że układ działa dla niemal dowolnych markerów, jednak w eksperymencie zastosowano przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko drugiemu receptorowi epidermalnego czynnika wzrostu HER2 oraz przeciwko receptorowi epidermalnego czynnika wzrostu EGFR, których nadekspresja jest specyficzna dla raka piersi. Wśród etapów biokonjugacji wyróżnia się: funkcjonalizację powierzchni przyszłego biosensora odpowiednim roztworem, przyłączenie grup aldehydowych do grup aminowych przeciwciał oraz zablokowanie pozostałych grup aldehydowych w celu uniknięcia reakcji niespecyficznych. Czułość biosensora sprawdzano za pomocą monitoringu zmian przewodności. Przyłączenie się wykrywanych cząsteczek (o ładunku dodatnim) powoduje wzrost bramkowego potencjału pozytywnego i w efekcie elektryczną przewodność. W przypadku pokrycia przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko HER2, progiem wykrywalności było stężenie 1pM, przy czym wystarczyło 1μl roztworu oznaczanego. Dla roztworu

EGFR minimalne wykrywane stężenie wyniosło 100 pM, oraz 10nM w obecności BSA. Różnice są spowodowane nie tyle dokładnością biosensora, co powinowactwem przeciwciał. W porównaniu do czytników cienkowarstwowych, również opartych na grafenie, jest to znaczna poprawa [27].

Inni badacze, używając elektrody pokrytej grafenem w połączeniu z aptamerem AS1411 (stosowany już w drugiej fazie testów klinicznych w diagnostyce odpornej ostrej białaczki szpikowej oraz raka nerki), są w stanie wykryć komórki rakowe nawet, gdy jest ich zaledwie tysiąc. Dodatkowym plusem jest możliwość regeneracji i ponownego użycia tak skonstruowanego aptasensora [24].

Kolejnym przykładem skuteczności aptasensora jest syntetyzowanie odcinka RNA łączącego się z zewnątrzkomórkową domeną białka ErbB2 (rodzina receptorów kinaz tyrozynowych). Już wcześniej wykazano, że nadekspresja lub zwiększona amplifikacja tego białka jest powiązana z wieloma nowotworami, w tym piersi, jajnika, żołądka, pęcherza moczowego, czy płuc. Dzięki doświadczeniom prowadzonym na liniach komórkowych, potwierdzono skuteczność aptameru RNA w wykrywaniu komórek raka piersi [29].

Wśród perspektyw wykorzystania aptasensorów należy wspomnieć o wersji przystosowanej do mierzenia poziomu interferonu γ (INF- γ). Na dzień dzisiejszy znana jest spora część szerokiego oddziaływania tej cytokiny, sugerując m.in. wiele różnorodnych powiązań z nowotworami. Naturalnie, wciąż potrzeba dokładniejszych badań nad mechanizmami molekularnymi funkcji pełnionych przez INF- γ , niemniej już zauważa się korelację między jego poziomem a rakiem. Biosensor, skonstruowany do wykrywania INF- γ , może okazać się pomocny w badaniach nad dokładną rolą tej cytokiny. Jako element rozpoznający omawianego aptasensora wykorzystano tiolowany DNA o strukturze spinki do włosów, immobilizowany na złotej elektrodzie. Stężenie interferonu γ określono za pomocą voltametrii fali prostokątnej (ang. *square wave voltammetry* SWV), przy minimalnym wykrywalnym poziomie 0,06nM i dużej specyficzności. Co ważne, aptasensory, często w przeciwieństwie do biosensorów wykorzystujących przeciwciała, nadają się do ponownego użycia po odpowiednim procesie regeneracji, co w efekcie znacznie obniża koszty produkcji i stosowania [30].

Interesującym przykładem użycia nanocząsteczek jest biosensor optyczny wykorzystujący zlokalizowany, powierzchniowy rezonans plazmonowy (ang. *localized surface plasmon resonance* LSPR). W tym wypadku posłużono się nanocząsteczkami srebra w formie trójkąta, zamiast powszechniej stosowanych nanocząsteczek złota. W efekcie uzyskano łatwy w wykryciu, silny sygnał LSPR. Poprzez użycie przeciwciał monoklonalnych myszy przeciwko p53, biosensor został przystosowany

do wykrycia białka p53 w surowicy osób cierpiących na kolczystokomórkowego raka skóry głowy i szyi. Powszechnie wiadomo, że nadekspresja białka p53 jest związana ze zmianami nowotworowymi. Wiele prac wskazuje zwiększenie poziomu p53 w surowicy u ponad połowy pacjentów z rakiem (definiowanym jako nowotwory wywodzące się z nabłonka) oraz u 91% pacjentów z rakiem kolczystokomórkowym skóry głowy i szyi. W związku z tym, istnieje duże zapotrzebowanie na urządzenie pozwalające na wykrywanie poziomu p53 w surowicy [31, 32].

Oprócz samego wykrycia nowotworu, niezwykle istotne jest zastosowanie prawidłowej terapii lekowej. Niestety, często nastręcza to sporych trudności, bo leki, które z założenia działają co najmniej dobrze, mogą okazać się nieskuteczne u danego pacjenta. Ogromne znaczenie ma więc możliwość jak najbardziej zindywidualizowanego dobierania terapii, albo przynajmniej jak najszybszej oceny skuteczności podanych leków. Pomocne tutaj okazują się biosensory, które w stosunkowo krótkim czasie pozwalają ocenić, czy pacjent jest lekooporny i wymaga innego sposobu leczenia. Przykładem takiego czujnika jest biosensor mierzący skuteczność cytarabiny (Ara-C), głównego leku przy białaczce mieloidalnej. Jako element biologiczny naukowcy wykorzystali całą komórkę *Escherichia coli*. Została ona specjalnie przystosowana do tego celu – poprzez szereg procesów uzyskano mutant nieposiadającego deaminazy cytydyny (cdd-), a posiadającego ludzki gen kinazy deoksycytydyny (DCK). W efekcie tych modyfikacji, mutant *E. coli* ma zwiększoną wrażliwość na Ara-CTP wbudowywany do swojego DNA. Dodatkowo tak przygotowany szczep stransformowano operonem *luxCDABE*. Dzięki temu komórki zyskały zdolność do bioluminescencji za sprawą transferazy, co jest o tyle wygodne, że podlega pod bezpośredni wpływ aktywności metabolicznej komórki. Wykorzystując luminometrię lub aparaty typu *low light* już po 8 godzinach można pobrać krew lub szpik kostny i ocenić poziom oraz aktywność cytarabiny w jednojądrzastych komórkach białaczkowych [33].

W przypadku biosensorów wykorzystujących jako biologiczny element rozpoznający całą komórkę mikroorganizmu, należy pamiętać o kilku kwestiach. Jedną z zalet tego typu biosensorów jest pomiar bioaktywnej ilości danej substancji, np. zanieczyszczenia, zamiast stężenia całkowitego. Jednak nie wiadomo, na ile jest to przeliczalne na bioaktywność w stosunku do organizmów wyższych. W porównaniu do metod klasycznych, wykorzystanie biosensorów jest wbrew pozorom tańsze. Są z zasady niewielkie, zatem łatwo je przenieść bezpośrednio do miejsca, w którym należy wykonać oznaczenie. Niweluje to konieczność pobrania próbki i jej, często skomplikowanego, transportu do laboratorium. Samo laboratorium musiałoby również być wyposażone w specjalistyczny, drogi sprzęt, np. różnego rodzaju spektrometry czy

chromatografy, które są dostępne w ograniczonej ilości ośrodków. Łączy się to z minimalizacją wkładu pracy i czasu potrzebnych do uzyskania wyniku. Niestety, nie można zapomnieć o problemach ze stabilnością genetyczną i wpływem środowiska reakcji na komórki używane w biosensorach. Czynniki te mogą negatywnie wpływać na przebieg reakcji oraz odczyt wyniku [34].

5. Perspektywy i ograniczenia

Wszystkie przykłady zastosowań biosensorów w praktyce diagnostycznej charakteryzuje skupianie uwagi na ich podstawowej zaletce: ogromnej specyficzności i wrażliwości na analit. W zależności od konkretnego układu, minimalne wykrywalne ilości oscylują w granicach od 10^{-18} do 10^{-9} M. Jednak naturalną konsekwencją takiej dokładności jest łatwość zaburzenia układu, przez zmianę warunków środowiska, np. pH lub obecność nieznannej substancji. Problem ten pojawia się przede wszystkim w przypadku analizy surowicy, w której może znajdować się bardzo wiele molekuł wpływających na powinowactwo biosensora. Czytniki, przede wszystkim te wykorzystujące przeciwciała, teoretycznie mogą być skierowane przeciwko dowolnej cząsteczce, dla której przygotowuje się przeciwciało. Powoduje to jednak ryzyko zmian powinowactwa pod wpływem środowiska reakcji i w efekcie zajścia reakcji niespecyficznej, co może dawać wynik fałszywie pozytywny. Dlatego szczególną uwagę przywiązuje się do optymalizacji biosensorów do pracy w danych warunkach. Zupełnie inną kwestią jest też standaryzacja otrzymywanych wyników, które naturalnie również mogą zmieniać swoje wartości i liniowość w różnych warunkach. Aby uniknąć problemów z analizą danych, konieczne jest zapewnienie odpowiedniego oprogramowania. Większość firm korzystających z biosensorów posiada potrzebne oprogramowanie i sprzęt, zapewniający przetwarzanie danych w prawidłowy sposób. Jednakże główny cel konstrukcji biosensorów, to ich komercjalizacja i wprowadzenie do powszechnego użytku w diagnostyce nowotworów. Takie założenie nasuwa konieczność udoskonalania systemu odbierania sygnału, aby jak najbardziej znormalizować uzyskiwane wyniki [23].

6. Wnioski

Wśród planów na przyszłość w zakresie rozwoju biosensorów naukowcy wskazują m. in. konieczność wprowadzenia niewielkich chipów umiejscowionych na ludzkim ciele, po to aby na bieżąco kontrolować funkcje życiowe, naprawiać nieprawidłowości lub sygnalizować nagłe sytuacje wymagające szybkiej interwencji. Wydaje się, że dalszy postęp w zakresie biosensoryki przyczyni się do efektywnej walki z chorobami nowotworowymi [9].

Piśmiennictwo / References

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>
2. Mohanty S, Kougiianos E. *Biosensors: a tutorial review*. IEEE Potentials 2006;25:35-40.
3. Rogers K. *Cancer Research - Nanoparticles, nanobiosensors and their use in cancer research*. Journal of Nanotechnology Online 2006;3:1-14.
4. Newman JD, Tigwell LJ, Warner PJ, Turner APF. *Biosensors: boldly going into the new millennium*. Sensor Review 2001;21:268 - 271.
5. Higson SPJ, Reddy SM, Vadgama PM. *Enzyme and other biosensors: evolution of a technology*. Eng Sci Educ J 1994;3:41-48.
6. Kissinger PT. *Biosensors - a perspective*. Biosens Bioelectron 2005;20:2512-2516.
7. Chambers JP, Arulanandam BP, Matta LL, Weis A, Valdes JJ. *Biosensor Recognition Elements*. Curr Issues Mol Biol 2008;10:1-12.
8. Van Staden JF, Aboul-Enein HJ, Stefan RI. *Biosensor Technology*. W: Cazes J. *Analytical Instrumentation Handbook-Second Edition* 2004:681-686.
9. Bohunicky B, Mousa AS. *Biosensors: the new wave in cancer diagnosis*. Nanotechnology, Science and Applications 2011:4 1-10.
10. Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. *Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification (Technical Report)*. Biosens Bioelectron 2001;16:121-131.
11. Shana A, Rogers KR. *Biosensors*. Meas Sci Technol 1994;5:461-472.
12. Rasooly A, Jacobson J. *Development of biosensors for cancer clinical testing*. Biosens Bioelectron 2006;21:1851-1858.
13. D'Orazio P. *Biosensors in clinical chemistry*. Clin Chim Acta 2003;334:41-69.
14. Rodriguez-Mozaz S, Marco MP, Lopez de Alda MJ, Barcelo D. *Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: a review article*. Anal Bioanal Chem. 2004;378:588-598.
15. Altschuh D. *Immunochemistry and biosensors*. <http://eson.fr/esonn2009/lectures09/Altschuh09.pdf> (2008)
16. Reder-Christ K, Bendas G. *Biosensor Applications in the Field of Antibiotic Research—A Review of Recent Developments*. Sensors 2011;11:9450-9466.
17. Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*. Biosens Bioelectron 2001;16:121-131.
18. Khalil AS, Collins JJ. *Synthetic biology: applications come of age*. Nat Genet 2010;11:367-379.
19. Garipcan B, Çağlayan MO, Demirel G. *New Generation Biosensors Based on Ellipsometry*. W: Serra PA. *New Perspectives in Biosensors Technology and Applications* 2011:197-214.
20. Doria G, Conde J, Veigas B, Giestas L, Almeida C, Assunção M i wsp. *Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications*. Sensors 2012;12:1657-1687.
21. Rodriguez-Mozaz S, Lopez de Alda MJ, Barcelo D. *Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring*. Anal Bioanal Chem 2006;86:1025-1041.
22. Turner AP. *Biosensors - sense and sensitivity*. Science 2000;290:1315-1317.
23. Sadana A. *Biosensors: Kinetics of binding and dissociation using fractals*. Elsevier B.V. 2003:57-158
24. Hong P, Li W, Li J. *Applications of Aptasensors in Clinical Diagnostics*. Sensors 2012;12:1181-1193.
25. Tuzel A. *Wszzechstronne detektory - aptamery nukleinowe*. <http://bioinfo.mol.uj.edu.pl/articles/Tuzel06> (2006)
26. Soper SA, Brown K, Ellington A, Frazier B, Garcia-Manero G, Gau V. *Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics*. Biosens Bioelectron 2006;15:1932-1942.
27. Myung S, Solanki A, Kim C, Park J, Kim KS, Lee KB. *Graphene-Encapsulated Nanoparticle-Based Biosensor for the Selective Detection of Cancer Biomarkers*. Adv Mater 2011;17:2221-2225.
28. Wang J. *Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics*. Biosens Bioelectron 2006;21:1887-1892.
29. Kim MJ, Jeong S. *In Vitro Selection of RNA Aptamer and Specific Targeting of ErbB2 in Breast Cancer Cells*. Nucleic Acid Ther 2011;21:173-178.
30. Liu Y, Tuleouva N, Ramanculov E, Revzin A. *Aptamer-based: Electrochemical Biosensor for Interferon Gamma Detection*. Anal Chem 2010;1:8131-8136.
31. Zhou WI, Ma Y, Yang H, Ding Y, Luo X. *A label-free biosensor based on silver nanoparticles array for clinical detection of serum p53 in head and neck squamous cell carcinoma*. Int J Nanomedicine 2011;6:381-386.
32. Chow V, Yuen AP, Lam KY, Ho WK, Wei WI. *Prognostic significance of serum p53 protein and p53 antibody in patients with surgical treatment for head and neck squamous cell carcinoma*. Head Neck 2001;4:286-291.
33. Alloush HM, Anderson E, Martin AD, Ruddock MW, Angell JE, Phil J i wsp. *A Bioluminescent Microbial Biosensor for In Vitro Pretreatment Assessment of Cytarabine Efficacy in Leukemia*. Clinical Chemistry 2011;56:1862-1870.
34. Strosnider H. *Whole-Cell Bacterial Biosensors and the Detection of Bioavailable Arsenic*. for U.S. Environmental Protection Agency, 2003

Adres do korespondencji / Mailing address:

Paulina Cynk
 Łopuszka Wielka 301, 37-220 Kańczuga
 KN „Bio- Tech”
 Zamiejscowy Wydział Biotechnologii
 Uniwersytetu Rzeszowskiego
 tel. 888-881-612
 e-mail: znp404@gmail.com