

T.C.

İstanbul

YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI



**MELANOM TESPİTİ İÇİN MEMS TABANLI
BİYOSENSÖR TASARIMI VE ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PELİN AKÇALI

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi SEVİL ÖZER

İSTANBUL, ARALIK 2022

T.C.
İstanbul
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

KABUL ONAY

Biyomedikal Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 02/12/2022

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Sevil Özer

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Sevil ÖZER

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Doçent Dr.Aysel ERSOY

İstanbul Üniversitesi/Cerrahpaşa

Dr. Öğr. Üyesi Sezen Canım ATEŞ

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

ETİK BEYAN

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

02/12/2022

PELİN AKÇALI

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca ilgi ve desteğini benden esirgemeyen,engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sevil ÖZER’e,

Tez dönemim boyunca her türlü yardımlarını eksik etmeyen ve bilgilerini paylaşmaktan ödün vermeyen sevgili sınıf arkadaşım Kübra KELLEÇİ’ ye,

Ayrıca tüm çalışmam boyunca beni sabırla dinleyen ve her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım, Ruken DAŞ, Liza DEMİRTAŞ, Furkan ERGEN ‘e,

Bugünleri görmemde bana en büyük katkıyı sağlamış olan ve benden maddi manevi hiçbir desteği esirgemeyen annem Sultan AKÇALI ve babam Ali AKÇALI , kardeşlerim PINAR AKÇALI, Mahir AKÇALI ve Anıl AKÇALI’ ya teşekkür ederim.

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

PELİN AKÇALI

ARALIK 2022

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	i
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER	viii
ÖZET.....	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. KONSOL TİPİ BİYOSENSÖRLER.....	5
2.1. Çalışma Prensibi	5
2.2. Mikro Konsolların Hassasiyeti	8
2.3. Mikro konsol AFM problemleri	9
2.3.1. Silikon bazlı konsol probu.....	9
2.3.2. Polimer bazlı konsol probu.....	10
2.4. Mikro Konsol Yüzeyinin işlevselleştirilmesi.....	10
2.5. Dikdörtgen Bimorf yapıda Mikro Konsolun Rezonans Frekansı	11
2.6. Bimorf üçgen V-şekilli konsolların rezonans frekansı.....	11
2.7. Hastalık Tespitinde Mikro konsol tabanlı Biyosensör Uygulamaları	13
3. MELANOM TESPİTİ İÇİN MEMS TABANLI BİYOSENSÖR TASARIMI VE ANALİZİ.....	18
3.1 Melanom Hakkında Genel Bilgi.....	18
3.2 Konsol Geometrisi ve Yüzeyinin İşlevselleştirilmesi	20
3.3 Sonlu Elemanlar Modelinin Oluşturulması	23
4. BULGULAR	26
4.1. Mikrokonsolların Yerdeğiştirme ve Frekans Kayma Değerleri	26
4.2. Teorik Hesaplama Sonuçları ve Karşılaştırma	31
4.3. Mikrokonsolların Frekans Modları	31
4.4. Mikrokonsolların AKM Ölçümleri	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	36
6. KAYNAKÇA.....	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. 1. Antijen-Antikor çiftleri konsolun bir yüzeyine seçici olarak bağlandığından, oluşturulan yüzey gerilimi nedeniyle konsol yapısı sapor (3).....	1
Şekil 1. 2. Tasarlanan V tipi Mikro konsol ve Dikdörtgen mikro konsolun gösterimi	4
Şekil 2. 2. (a): Mikrofabrikasyon teknolojisi ile üretilen Silikon (SOI) konsollar (18).....	8
Şekil 2. 3. (a): Bruker MLCT tipi AKM problemleri, (b): Hücre uygulamalarında, Kolloidal AKM problemleri geniş kullanıma sahiptir (24).....	9
Şekil 2. 4. Organik çok tabakalar kullanarak kovalent immobilizasyon şeması. (26) (27).....	10
Şekil 2. 5. Dikdörtgen bir konsol girişin şematik çizimi (28).....	11
Şekil 2. 6. (a) bimorf V-şekilli konsolun (b) bimorf V-şekilli konsolun yarısı (c) üçgen konik konsolun şekli ve boyutu. (28).....	12
Şekil 2. 7. (a) MEMS konsol dizi sensörünün yapısı, (b) SiO ₂ konsol dizisinin antikorların immobilizasyonu üzerine yer değiştirmesi (32).	14
Şekil 2. 8. (a) Konsol dizaynı 3 giriş halinde, (b) A + kan grubu, (c) B + kan grubu tayini (33)	14
Şekil 2. 9. Önerilen Sensörün Geometrisi (a) Konsol girişi (b) yer değiştirme (34)..	15
Şekil 2. 10. (a) Üçgensel mikrokonsol üzerinde yapılan sonuçlar (b) Pi şeklinde mikrokonsol üzerinde yapılan sonuçlar (30).....	16
Şekil 2. 11. (a) Modelin geometrisi (b) Mikrokonsol üzerinde oluşan stres (31)	17
Şekil 2. 12. 2D Prob dizi sistemi ve aşamaları (a) küresel uçlu 3x8 konsol ve köşelerde daha yüksek piramidal uçlu 4 hizalama konsolu içeren bir çip, (b) hizalama konsollarından birinin yanında oluklu iki prob ve (c) küresel bir yakın görünümün SEM gözlemleri. Ölçülen yarıçap ise 3,8 µm'dir. (29)	17
Şekil 3. 1. (a) Bimorf V tipi konsolun Sonlu elemanlar modeli yazılımı kullanılarak tasarımı. (b) Tasarlanan dikdörtgen mikro konsolun COMSOL Multiphysics yazılımı kullanılarak Geometrik çizimi	21
Şekil 3. 2. V tipi ve Dikdörtgen mikro konsolun modellemesi.....	21
Şekil 3. 3. (a-b) Mavi ile belirtilen sınırlar sabitlenmiştir. (c-d) Mikro konsolların mavi ile belirtilen Altın kaplı üst yüzeyine 9.6142*10 ⁻¹¹ N/m ² basınç uygulanmıştır. (e-f) Mikro konsola ince ağ (fine meshing) uygulaması yapılmıştır.	24

Şekil 3. 4. Referans alınan (a) ScanAsyst-Fluid AKM probu (48) ve (b) MLCT-B ve MLCT-F Fluid AKM probu modeli (24).	25
Şekil 4. 1 (a) V tipi Mikro konsol da gerçekleşen 4 µm yer değiştirme , (b) Dikdörtgen Mikro konsol da gerçekleşen 8 µm yer değiştirme.....	26
Şekil 4.2. Dikdörtgen tipi mikro konsol üzerine uygulanan sırasıyla Altın eklenmesi (b) , Antikor (c) ve Antijen-Antikor (d) immübilizasyonu sonucu rezonans frekansta gerçekleşen kayma.....	28
Şekil 4. 3. V tipi mikro konsol üzerine uygulanan sırasıyla Altın eklenmesi (a) , Antikor (b) ve Antijen-Antikor (c) immübilizasyonu sonucu rezonans frekansta gerçekleşen kayma.....	29
Şekil 4. 4. V tip mikro konsol üzerine uygulanan sırasıyla Altın (Gold) (sarı) , Antikor (Antibody) (kırmızı) ve Antijen-Antikor (Antigen+Antibody) (mavi) immübilizasyonu sonucu rezonans frekansta gerçekleşen kayma ve yer değiştirme genlikleri.....	30
Şekil 4. 5. Dikdörtgen mikrokonsolun ilk altı özfrekans değerleri: 18.171 kHz (L), 113.85 kHz (L), 319.09 kHz (L), 348.39 kHz (T), 626.01 kHz (L) ve 710.38 kHz (T)	32
Şekil 4. 6. V tipi mikrokonsolun ilk altı özfrekans değerleri: 155.91 kHz (L), 852.18 kHz (L), 914.4 kHz (T), 2259.1 kHz (L), 2408.1 kHz (L-T) ve 3984.4 kHz (L-T) ...	33
Şekil 4.7. (a) Bruker Dimension Egde, (b) Bruker MLCT (B)-dikdörtgen (C-D-E-F) V tipi mikrokonsolları (24)	34
Şekil 4.8. Dimension Edge kullanarak, MLCT-B dikdörtgen tipi (Şekil 4.8b) mikrokonsolun termal ayar (thermal tune) modu ve dokunma modu ile (tapping mode) (Şekil 4.8a) rezonans frekans değeri-Pik değeri 14.770 Hz göstermektedir.....	35

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. V tipi ve dikdörtgen mikrokonsolun fiziki ölçüleri ve uygulanan basınç değerleri.....	23
Tablo 2. Konsolda kullanılan Si_3N_4 , Altın ve PDMS malzemelerinin özellikleri	23
Tablo 3. Dikdörtgen mikrokonsolda rezonans frekansında gerçekleşen kayma değerleri.....	28
Tablo 4. V tipi mikrokonsolda rezonans frekansında gerçekleşen kayma değerleri .	30
Tablo 5. Simülasyon ve Teorik sonuçların karşılaştırması	31



KISALTMALAR VE SİMGELER

Kısaltmalar

MEMS	: Mikroelektromekanik Sistemler
NEMS	: Nanoelekromekanik Sistemler
FAE	: Sonlu Elemanlar Analizi
AKM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
MITF	: Mikroftalmi ile ilişkili transkripsiyon faktörü
D5	: Antikor
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SAM	: Kendiliğinden oluşan monotabaka
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
MAGE-1:	Melanoma kanser antijeni-A1
SiO ₂	: Silikon Oksit
TB	: Tüberküloz
Au	: Altın
Cu	: Bakır
Si	: Silikon
Pt	: Platinyum
RNA	: Ribonükleik asit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
PDMS	: Polidimetilsiloksan
SM5-1	: Monoklonal antikor
Si ₃ N ₄	: Silikon Nitrür
SU-8	: Fotorezist

Simgeler

Δf	: Ölçülen frekans kayması
f_0	: Rezonans frekansı
Δm	: Kütle değişimi
Hz	: Hertz
E	: Young modülü
H	: Kalınlık
L	: Uzunluk
W	: Genişlik
ρ	: Yoğunluk
m	: Kütle
k	: Yay sabiti
$\Delta \sigma$	: Yüzey gerilimi değişimi
Δz	: Konsol serbest uç yer değiştirmesi
Q	: Kalite faktörü
μm	: Mikrometre
nm	: Nanometre
I	: Atalet momenti
u	: Genişlik oranı
v	: Uzunluk oranı
Da	: Dalton
kDa	: Kilo Dalton
ϑ	: Poisson Oranı
P	: Basınç
a	: İvme
Pa	: Basınç birimi
μl	: Mikrolitre
Δh	: Sapma

ÖZET

Melanom Tespiti İçin MEMS Tabanlı Biyosensör Tasarımı ve Analizi

Pelin AKÇALI

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Sevil ÖZER

ARALIK 2022, 53 sayfa

Bu çalışma kapsamında melanom biyobelirteci olan MITF ve D5 antikorları arasındaki spesifik etkileşim dinamiklerinden ve moleküller arası bağlanma yeteneğinden faydalanılarak bir Atomik Kuvvet Mikroskobu konsolunun fonksiyonel hale getirilerek MEMS tipi bir mikro konsol biyosensör tasarlanması yapılmıştır. Mikro konsolun yüzeyi, MITF antijenine özgü olduğu bilinen D5 monoklonal antikorları (anti-MITF) ile kaplanmıştır. MITF antijeni eklendiğinde, MITF antijeni ile D5 antikorları arasında birbirlerine olan affiniteleri nedeniyle biyokimyasal reaksiyonlar meydana gelir ve bir antijen-antikor kompleksi oluşur. Bu kompleks konsol üzerinde stres ve gerilim oluşturur. MITF-D5 arasındaki etkileşimler sonucu gerçekleşecek gerilim veya stres, konsolun rezonans frekansındaki sapma değerinden tespit edilmiştir. Konsol tipi mikro biyosensörlerin yüzeyinin fonksiyonlaştırılması Sonlu elemanlar analizi (FAE) kullanılarak yapılmıştır. Simülasyon sonuçları nümerik hesaplamalar ve AKM sonuçları ile desteklenmiştir. Elde edilen simülasyon sonuçlarında mikrokonsol üzerine tanımlanan D5 ve MITF antijenlerinin birleşimi sonucu ortaya çıkan sapma değeri V tip mikrokonsol için, rezonans frekansı 155.91 kHz , Dikdörtgen tip mikrokonsol için ise rezonans frekansı 14.910 kHz olarak hesaplanmıştır. Yapılan Teorik ve simülasyon sonuçlarında % 0.6436 ve %17.46 değerinde hata payına rastlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Melanoma, MITF,D5,Antijen-Antikor etkileşimleri, AKM Konsolu, Konsol tipi Biyosensör

ABSTRACT

MEMS-Based Biosensor Design and Analysis for Melanoma

Pelin AKÇALI

İstanbul Yeni Yüzyıl University, Science and Engineering Institute

Master Thesis, Biomedical Engineering Department

Supervisor: Assistant Prof. Dr. Sevil ÖZER

December 2022, 53 pages

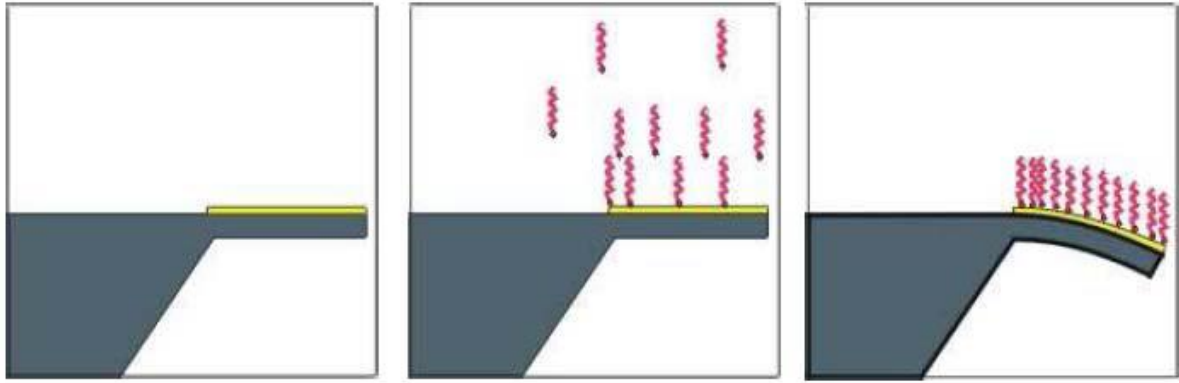
Within the scope of this study, a MEMS type microcantilever biosensor was designed by functionalizing an Atomic Force Microscope (AFM) console by taking advantage of the specific interaction dynamics and intermolecular binding ability between MITF and D5 antibody, which are melanoma type cancer biomarkers. The surface of the microcantilever is coated with D5 monoclonal antibodies (anti-MITF) which is known to be specific to the MITF antigen. When the MITF antigen is added, biochemical reactions occur between the MITF antigen and the D5 antibody due to their affinity for each other, and an antigen-antibody complex is formed. This complex creates stress and tension on the cantilever. The stress that will occur as a result of the interactions between the MITF-D5 has been determined from the deviation in the resonant frequency of the cantilever. Surface functionalization of cantilever microbiosensors was performed by using Finite Element Analysis (FAE). The simulation results were supported by numerical calculations and AFM results. Simulation outputs shows the resonance frequency value resulting from the combination of D5 and MITF antigens on the microconsole is 155.91 kHz for V type microconsole, and resonance frequency 14.910 kHz for rectangular type microconsole.

Keywords: *Melanoma, MITF ,D5 , Antigen-,Antibody Interaction, AFM Cantilever, Cantilever based biosensor*

1. GİRİŞ

Mikro ve nano-elektro-mekanik sistemler (MEMS ve NEMS) olarak minyatür ve entegre cihazların üretimi, mekanik fenomenleri içeren dönüştürücülere dayalı yenilikçi bir biyokimyasal sensör ailesinin geliştirilmesini sağlamıştır. Mikro konsollara dayalı biyosensörler, özellikle bir optik okuma şeması uygulandığında, biyomoleküler etkileşimleri büyük bir doğrulukla doğrudan tespit etmek için umut verici bir araç haline gelmiştir. Bu sensörlerin uygulamalarının sayısı, genomik, proteomik, çevresel veya gıda kalitesi kontrolü gibi çeşitli alanlarda hızlı bir büyüme göstermiştir ve şu anda kullanılan biyosensör tekniklerine umut verici bir alternatiftir (1).

Mikro mekanik konsollar en umut verici biyosensörlerden biridir. Konsol tabanlı algılama, indüklenmiş yüzey baskısı, ilave kütle veya ısı transferi nedeniyle konsol kirişinin önemli bir sapmasına dayanır (2).



Şekil 1. 1. Antijen-Antikor çiftleri konsolun bir yüzeyine seçici olarak bağlandığından, oluşturulan yüzey gerilimi nedeniyle konsol yapısı sapar (3)

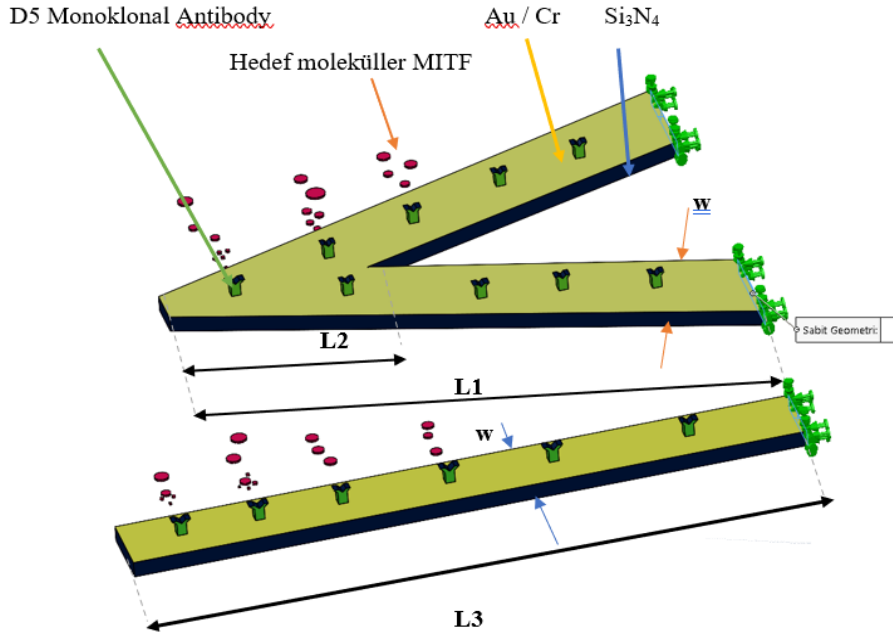
Mikro konsol kirişler, çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik uygulamalarda kullanılan bir tür MEMS cihazıdır (4) . MEMS, çeşitli biyolojik işlemlerde mikro ölçekli bir biyosensör olarak kullanılmıştır. Mikro konsol tabanlı biyosensörler, duyarlılıkları ve kararlılıkları nedeniyle hastalıkların teşhisinde önemli bir rol oynamaktadır. Boyları, 1 ile 100 μm arasında değişen konsol tabanlı sensörler, geleneksel biyolojik sensörlere kıyasla daha ekonomik üretim olanaklarına sahiptir, boyut olarak taşınabilir ve hafif olarak dizayn edilir, ayrıca yüksek hassasiyeti, kolay kullanımı, düşük analit gereksinimi (μl olarak) ve hızlı yanıt vermesi avantajları olarak değerlendirilmektedir (5).

MEMS mikro konsollar, bir ucu sabit, diğeri yer değıştirme için serbest olan biyosensörlerdir. Yer değıştirme, konsolun hassas yüzeyinde antijen ve antikorun etkileşiminin neden olduğu stresten kaynaklanır. Konsol kiriş, antijen ile etkileşime girmek için konsol kirişin üst yüzeyinde spesifik antikoru hareketsiz hale getirdikten sonra sapar. Kirişin üst yüzeyine spesifik antikorlar bağlayarak, konsol yüzeyi hassas hale gelir (Şekil 1.1). Konsol mikro boyutlardaki yapısı nedeniyle, moleküler seviyede değıişimlere hassasiyetleri ve biyo-moleküler elementleri tespit etmedeki performansları yüksektir. Bir mikro konsolda, moleküler tanımların neden olduğu yüzey gerilimi nano-mikro mekanik tepkilere çevrilir. Bu nano-mikro mekanik reaksiyonlar, mikro konsol malzemesinin kapasitansında, piezo direncinde veya rezonans frekansında bir değıişikliğe neden olur. Ligand bağlanması nedeniyle bu mekanik bükülme, mikro konsol yüzeyinin bir tarafında hareketsizleştirilmiş reseptör moleküllerinin tek tabakası tarafından tespit edilir. Biyoreseptör ve antijen birbiriyle etkileşime girdiğinde, konsol yüzeyindeki ağırlık artar ve mikro konsolun serbest ucunda bükülme meydana gelir. Mikro konsol yüzeyinde meydana gelen moleküler işbirlikleri, mikro konsolu bükülmeye zorlayarak yüzey gerilimini artırır. Mikro konsol üzerinde meydana gelen serbest enerji değıişiklikleri, o belirli molekül çiftine (örneğin antikor-antijen) özgüdür. Konsol kirişinin sapması, piezoelektrik, piezodirençli, kapasitif veya optik yöntemler kullanılarak tespit edilebilir.

Cilt kanserinin en agresif ve en ölümcül formunu temsil eden melanom, cilt kanserine bağlı ölümlerin yaklaşık %75'inden sorumludur (6) ve yüksek direnci nedeniyle prevalansı %80'dir. Uzun süreli sağkalım için erken tanı ve etkili tedavinin kritik olduğu bilinmektedir. Erken evre malign cilt kanserleri için beş yıllık sağkalım oranı %99'dur ve metastaz sonrası hayatta kalma oranı %15 kadar düşüktür (7). Melanomun erken teşhisi, erken sağ kalım oranını artırmak için çok önemlidir. Melanom tanısında kullanılan ELISA ve PCR gibi serolojik yöntemler ve tıbbi görüntüleme yöntemleri, çok miktarda numuneye ihtiyaç duyulması, uzun tespit süreci, yüksek maliyet, kalifiye personel ve pahalı laboratuvar ekipmanı ihtiyacı gibi sınırlamalara sahiptir. Mikro-elektro-mekanik sistem (MEMS) teknolojisi kullanılarak, farklı hastalık türlerinin analizi, teşhisi ve tedavisine yönelik çalışmalar son yıllarda birçok araştırmanın konusu olmuştur (8). Melanom teşhisi ve evrelemesindeki zor koşullar göz önüne alındığında, melanom teşhisi için alternatif, daha basit ve daha az maliyetli tekniklerin geliştirilmesine acil bir ihtiyaç vardır. Melanom, hayatı tehdit edebilen kötü huylu bir deri kanseridir. Melanosit olarak adlandırılan tespiti oldukça zaman alan melanomun tedavisine yönelik atılması gereken ilk adımlardan biri doğru ve etkin tanının konmasıdır. Literatür incelendiğinde melanom

biyobelirteçleri arasında yüksek hassasiyet ve özgüllük sağladığı bilinen MITF ve MITF'nin insan monoklonal antikorları olan D5 antikorları arasındaki etkileşimin sadece immunohistokimyasal yöntemler ile tespit edildiği görülmüştür. Oysa antijen-antikor arasındaki spesifik bağlanma kuvvetlerinin ölçümü ve analizi, tümör belirteçlerinin biyolojik işlevlerini daha iyi anlamak, hastalık teşhisinde ve tedavisinde uygulanacak yöntemlerin geliştirilmesi, doğru ve hızlı tanı, hastalıkların tedavisine yönelik ilaç ve aşı tasarımı amacıyla oldukça önemlidir. Melanomun histolojik tanısında %100'e kadar bir özgünlüğü ve hassasiyeti olduğu bilinen MITF antijeni ve D5 antikorları arasındaki etkileşim kuvvetinin ve varlığının belirlenmesi, hastalığın tanı ve tedavisine yönelik çalışmalarda araştırmacılara farklı bir bakış açısı kazandıracaktır.

Bu çalışmada da, melanom tespiti için hızlı ve doğru bir yöntem sunan bir MEMS mikro konsol sensörü tasarlanmış ve simüle edilmiştir. Çalışmada hem V tipi hem de Dikdörtgen tipi mikro konsol yapıları incelenmiştir (Şekil 1.2). Başlangıç olarak sırasıyla uzunluk, genişlik ve kalınlık için boyutları ($80\text{ }\mu\text{m} \times 60\text{ }\mu\text{m} \times 0.2\text{ }\mu\text{m}$) olan V tipi ve ($210\text{ }\mu\text{m} \times 20\text{ }\mu\text{m} \times 0.2\text{ }\mu\text{m}$) dikdörtgen Silikon Microcantilever kullanılmış olup konsolun üst kısmında, analitlerin tutturulması için Gold katmanı tanımlanmıştır. Mikro konsolun yüzeyi, MITF antijenine özgü olduğu bilinen D5 monoklonal antikorları (anti-MITF) ile kaplanmıştır. D5 monoklonal antikorları üzerine MITF antijeni içeren bir serum (örneğin melanomlu hastadan alınan bir kan örneği olabilir) ilave edildiğinde MITF antijeni ile D5 antikorları arasında birbirlerine duydukları affinite nedeniyle biyokimyasal reaksiyonlar meydana gelerek antijen-antikor kompleksi oluşur. Bu çalışmada, AKM mikro konsolları üzerinde, bu antijen-antikor kompleksi modellenmiştir. Oluşan kompleks sonucunda, konsol üzerinde bir stres ve gerilim meydana gelmektedir. Bu çalışmada, antijen-antikor kompleksi modellenerek, konsol üzerinde stres ve gerilim oluşturulmuştur. MITF-D5 arasındaki etkileşimler sonucu gerçekleşecek gerilim veya stres, konsolun rezonans frekansındaki sapma değeri ve rezonans frekansındaki kaymadan tespit edilmiştir. Konsol tipi mikro biyosensörlerin yüzeyinin fonksiyonlaştırılması Modelleme için, sonlu elemanlar analizi (FAE) kullanılmıştır. Simülasyon sonuçları, nümerik hesaplamalar ve AKM sonuçları ile desteklenmiştir.



Şekil 1. 2. Tasarlanan V tipi Mikro konsol ve Dikdörtgen mikro konsolun gösterimi

Tezin ikinci bölümünde ilk olarak konsol tipi biyosensörlerin yapıları, çalışma hassasiyetleri, çeşitleri ve yüzeylerinin işlevselleştirilmesi konularına değinilerek, konsol tipi biyosensörler ile ilgili yapılan modelleme çalışmalarından bahsedilmiştir, Tezin method ve yöntemler bölümünde melanom biyobelirteci olan MITF ve D5 antikoru arasındaki spesifik etkileşimin varlığını tespit amacıyla tasarımı yapılan V tipi ve dikdörtgen tipi AKM konsol biyosensörünün simülasyon parametreleri verilmiş, simülasyon sonuçları tezin dördüncü bölümünde, nümerik analiz değerlendirilmeleri ve AKM sonuçları ile birlikte değerlendirilmiştir.

2. KONSOL TİPİ BİYOSENSÖRLER

Konsol Biyosensörler, nano ve mikro elektromekanik sistemlerin yüksek derecede hassas biyosensörlerde dönüştürücülerde uygulanmasıdır. “Nanomekanik biyosensörler” olarak adlandırılan bu cihazlarda biyomoleküler bir etkileşim, dönüştürücünün mekanik davranışında (nanometre ölçeğinde bir hareket) gerçek zamanlı olarak ölçülebilen ve analiz edilebilen bir değişiklik üretir. Mikro konsollar, biyomoleküllerin moleküler tanınmasını, genellikle bir optik okuma sistemine bağlanan nanomekanik bir harekete dönüştürür (9). Bir ucunda sıkıştırılmış dikdörtgen bir kiriş (Şekil 2.1), mikrometre ölçeğinde kolayca toplu olarak üretilen en basit mekanik yapı olduğu için en çok kullanılan dönüştürücüdür (10). Nanomekanik sensörler, analitleri pikomolar hassasiyetle algılayabilir veya DNA dizilerindeki tek bazlı varyasyonları ayırt etme yeteneğine sahiptir. Son zamanlarda, mikro konsol tabanlı biyosensörler, son derece düşük kuvvetleri ve kütleleri doğrudan ölçmek için rekabetçi bir biyosensör alternatifi olarak ortaya çıkmıştır. Nano ölçekte üretildiğinde (*nanocantilevers*), hassasiyet artar ve beklenen algılama limitleri femtomole-attomole aralığında olur, ve bu durumda gerçek zamanlı olarak tek molekül seviyesinde algılama olasılığı vardır (11). Tezin bu bölümünde, mikro konsol sensörlerinin fizikine ilişkin ana hususlar açıklanacak, konsol yüzeyinin biyolojik olarak işlevselleştirilmesi ve hastalık tespitinde mikro konsol tabanlı biyosensör uygulamalarına değinilecektir.

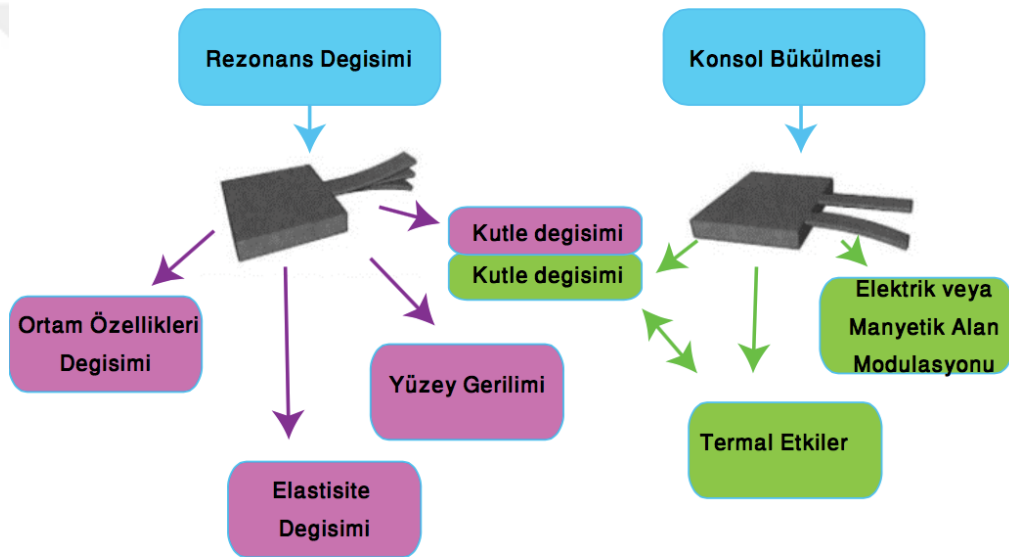
2.1. Çalışma Prensibi

Nanomekanik-mikromekanik sensörler; AFM kullanılan mikrofabrike konsollardan türetilir ve örneğin yüzeylerinden birinde bir biyomoleküler etkileşim meydana geldiğinde konsolda indüklenen bükülme veya rezonans değişikliğine dayanır. Konsol yanıtı, esas olarak yay sabiti ve rezonans frekansı ile belirlenen mekanik özelliklerine bağlı olacaktır. Her iki parametre de konsol malzemesine ve geometrisine bağlıdır. Bir ucunda kenetlenmiş basit bir dikdörtgen konsol yapısı için yay sabiti, k ve rezonans frekansı, f_0 Denklem 2.1 ve Denklem 2.2 de verilmektedir (10).

$$k = \frac{Ewh^3}{4L^3} \quad \text{Denklem 2.1}$$

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad \text{Denklem 2.2}$$

burada E Young modülüdür , m konsolun etkin kütlesidir, w genişliktir , h kalınlıktır, ve L ise uzunluktur. Moleküllerin konsol yüzeylerinden biriyle etkileşimi veya bağlanması, konsolun bükülmesine veya rezonans frekansında bir kaymaya neden olabilir. Bu yanıtların tespiti genellikle sırasıyla **statik ve dinamik** çalışma modları olarak adlandırılır. Ancak mekanik tepki, sıcaklık, ısı, elektromanyetik alan gibi farklı faktörlere de duyarlıdır. Konsol bükülme açısı ve rezonans frekansındaki değişim, molekül etkileşimi sonucu oluşan stres ve kütle değişimine bağlıdır. Bu dönüştürücüler, biyosensörlerin yanı sıra çeşitli uygulamalar için kullanılabilir. Şekil 2.1, konsol tipi biyosensörlerin hem dönüştürücü yöntemlerini hem de ölçülebilen özelliklerle ilişkisini gösteren bir diyagramı göstermektedir.



Şekil 2. 1. İki nanomekanik tepki yönteminin şeması: statik ve dinamik; ve her biri ile ölçülebilen özellikler.

Statik modda çalışan sensörlerde , eğilme, konsol yüzeylerinden sadece birinde meydana gelen herhangi bir moleküler reaksiyonun neden olduğu bir yüzey stresi değişikliğinin bir sonucu olarak ortaya çıkar. İndüklenen yüzey gerilimi değişimi, oluşturulan yüzey deformasyonuna bağlı olarak pozitif veya negatif olabilir (12). Konsolların deformasyonu biyolojik reaksiyon sürecinde yer alan kuvvetlere bağlıdır ve doğrudan reseptör-ligand bağlanma enerjisi ile ilgili değildir. Bu kuvvetler, reseptör ve yüzey arasındaki bağ kuvvetinden ve moleküller arası

etkileşimlerden kaynaklanabilir. Bu değişimden sorumlu faktörler henüz tam olarak anlaşılmamış olsa da, elektrostatik, van der Waals etkileşimlerinden gelen kuvvetler, yüzey hidrofobitesindeki değişimler veya adsorbe edilen moleküllerin konformasyonel değişiklikleri önemli bir rol oynayabilir (13). Konsollarda üretilen yüzey gerilimini incelemek için en kolay ve en kapsamlı model, Stoney'nin (14) (1909) çalışmasına dayanmaktadır. Bu model, üst ve alt taraflar arasındaki toplam yüzey gerilimi değişimini ($\Delta\sigma_1 - \Delta\sigma_2$); konsol serbest uç yer değiştirmesi Δz , Young modülü, E , Poisson katsayısı ν ve konsol uzunluğu L ile ilişkilendirir. Denklem 2.3 de yer alan h , konsol kalınlığını temsil etmektedir (10).

$$\Delta\sigma_1 - \Delta\sigma_2 = \frac{Eh^2}{3L^2(1-\nu)} \Delta z \quad \text{Denklem 2.3}$$

Statik modda biyomoleküler etkileşimleri algılamak için, mikro konsolun yalnızca bir yüzeyi önceden biyo fonksiyonelleştirilmelidir.

Statik durumun aksine, **dinamik** mod, rezonans frekansı her iki tarafta adsorbe edilen toplam kütleye bağlı olduğundan, yalnızca bir konsol yüzeyinin işlevselleştirilmesini gerektirmez. Bu kütle, aynı zamanda, konsol yay sabitinde nihai rezonans frekans kaymasını etkileyen bir değişiklik üretebilir (15). Bu modda, kuvars kristali mikro terazisi (QCM) gibi diğer benzer kütle dedektörlerinden daha üstün olan (attogram aralığında) çok yüksek hassasiyetler elde edilebilir (16). Mikro konsol rezonatör ayrıca enerji kaybını ölçen ve titreşim döngüsü başına biriken mekanik enerji ile dağılan mekanik enerji arasındaki oran olarak tanımlanan kalite faktörü (Q) ile de karakterize edilir. Enerji tüketen mekanizmalar hem dahili hem de harici olabilir; hava veya sıvılarda çalışırken dış sönümleme baskın faktördür. Kalite faktörü (Q), sistemin frekans çözünürlüğünü belirler, Denklem 2.4'de görüldüğü üzere rezonans frekansı ve frekans kaymasından Q faktörüne erişilir (17):

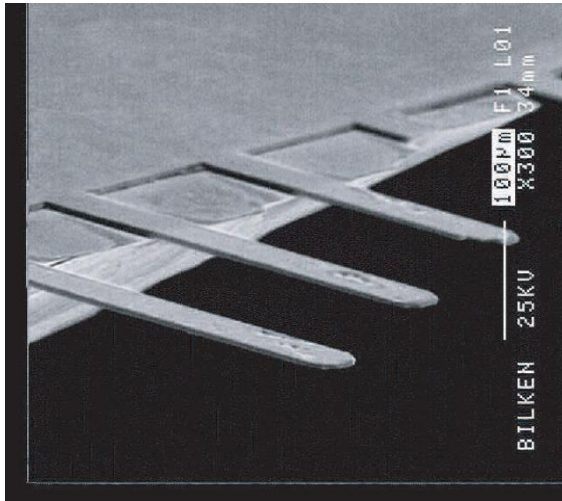
$$\Delta f = \sqrt{3} \frac{f_0}{Q} \quad \text{Denklem 2.4}$$

Sıvı ortamda yapılan çalışmalarda, rezonans frekansı ve kalite faktörü, viskoz çevrenin sönümleme etkisinden dolayı havaya göre çok daha düşük değerlere kayar. Sıvılardaki kalite faktörü, havadakinden 100 kata kadar daha düşük olabilir ve bu da frekans çözünürlüğünü azaltır. Bu sınırlamanın üstesinden gelmenin farklı yolları vardır. Bu yollar, (a); daha yüksek rezonans frekansı ve kalite faktörlerine sahip konsollar üreterek, (b); kontrollü nem altında

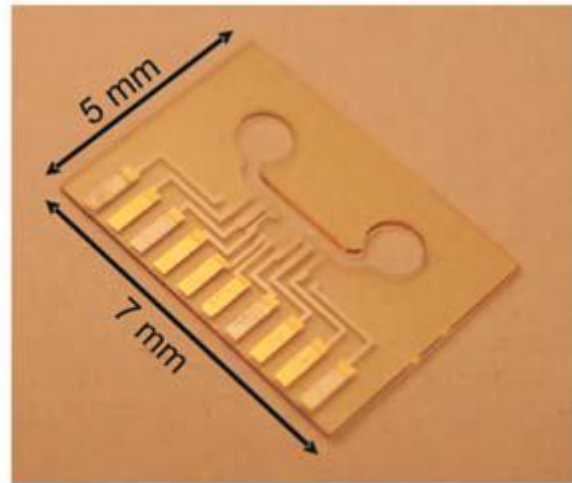
havada rezonans frekansını biyokimyasal tanımadan önce ve sonra ölçerek, (c); daha yüksek dereceli titreşim modlarıyla çalışarak.

2.2. Mikro Konsolların Hassasiyeti

Tipik olarak, konsol boyutları ~10-500 mikrometre uzunluğunda, ~5-50 mikrometre genişliğinde ve ~10-500 nanometre kalınlığındadır. Genel olarak silikon, silikon nitrit, polimerler veya piezoelektrik malzemelerden yapılırlar. Mikro konsol özellikleri ve hassasiyeti, konsol boyutları ve malzemesi (*E*-Young modülü ve *v*- Poisson katsayısı) tarafından belirlenir. Uygun özelliklerin seçimi, çalışma algılama yöntemine (statik veya dinamik), son uygulamaya ve mevcut üretim teknolojisine bağlıdır. Genel olarak, daha küçük yay sabitleri daha yumuşak konsollar verirken, bükülmeye daha duyarlıdır ve genellikle sıvı içerisinde kullanıma uygundur. Daha ince ve daha uzun konsollar yapmak hassasiyeti artırabilir, ancak bunlar aynı zamanda daha kırılabilir yapıda olup daha hassas uygulama gerektirir. Ayrıca termomekanik gürültü, daha uzun yapılarda yüzey alanının genişlemesinden dolayı artar, bu da ölçüm hassasiyetini düşürmektedir. Yüksek uzunluk:kalınlık oranına sahip olmasalar bile SU-8 gibi polimerler, silikondan daha düşük Young modülüne sahiptir ve statik sapma ölçümleri için daha hassastır; imalat süreçleri de nispeten daha ucuz, hızlı ve güvenilir (19).



(a)



(b)

Şekil 2. 1. (a): Mikrofabrikasyon teknolojisi ile üretilen Silikon (SOI) konsollar (18).

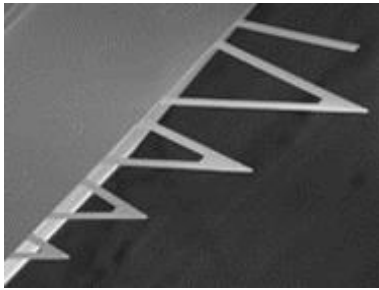
(b): SU-8 çipinin tamamının optik görüntüsü. Konsollar mikro kanalda bulunmaktadırlar (19).

2.3. Mikro konsol AFM probları

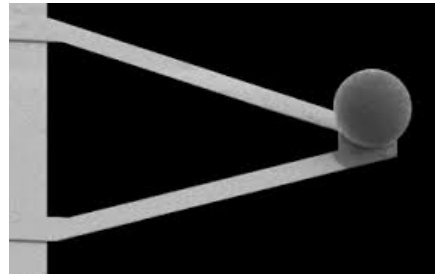
Genellikle, tahribatsız, yüksek hızlı, yüksek çözünürlüklü topografik görüntüleme gerektiren biyolojik araştırmalar (hücre membranı, morfolojisi veya hücrel örneklerin nanomekanik karakterizasyonları vb.) için serbest ucunda keskin uçlu polimer bazlı V şeklinde bir konsol içeren çok yumuşak bir AFM probu kullanılmaktadır. AFM probları silikon bazlı ve polimer bazlı olmak üzere ikiye ayrılır.

2.3.1. Silikon bazlı konsol probu

Si tabanlı ve Si_3N_4 tabanlı konsol probları, günümüzde ağırlıklı olarak hücre altı ve hücrel numunelerin AFM sistemi için kullanılmaktadır (20) (21). Bununla birlikte, silikon bazlı konsol probu, Si'nin elastik modülü canlı hücrelere oranla daha büyük olduğundan (22) (23), topografi ve canlı hücrelerin mekanik özelliklerinin ölçülmesi sırasında canlı hücrelere zarar verebilmektedir. Hücre zarındaki deformasyonu/bozulmayı en aza indirmek için çok düşük bir tarama hızı (~ 0.1 Hz) ile yüzey morfolojinin incelenmesi ve görüntü alınması gerekmektedir. Bu da görüntü çerçevesi başına 512 satır için 1,5 saatlik bir görüntüleme süresi anlamına gelir ki, fizyolojik ortamlarda canlı hücrelerle çalışılması için oldukça uzun bir süre anlamına gelir. Aynı durum, canlı memeli hücrelerinin nanomekanik ölçümlerinde (E - Elastik modül ölçümleri) geçerlidir, ve düşük bir kuvvet yük hızında (< 10 Hz) bu deneylerin gerçekleşmesi gerekmektedir. İndentasyon deneyleri sırasında, Si tabanlı problarla, tekrarlayan bir aynı yer girintisi (indentasyon), hücre zarının hasar görmesine ve parçalanmasına neden olabilir. Aynı tasarım ve boyutlar göz önüne alındığında, polimer bazlı konsol prob, polimerlerin elastik modülü Si'ninkinden daha düşük olduğundan , Si bazlı olana oranla çok daha yumuşak olacaktır.



(a)



(b)

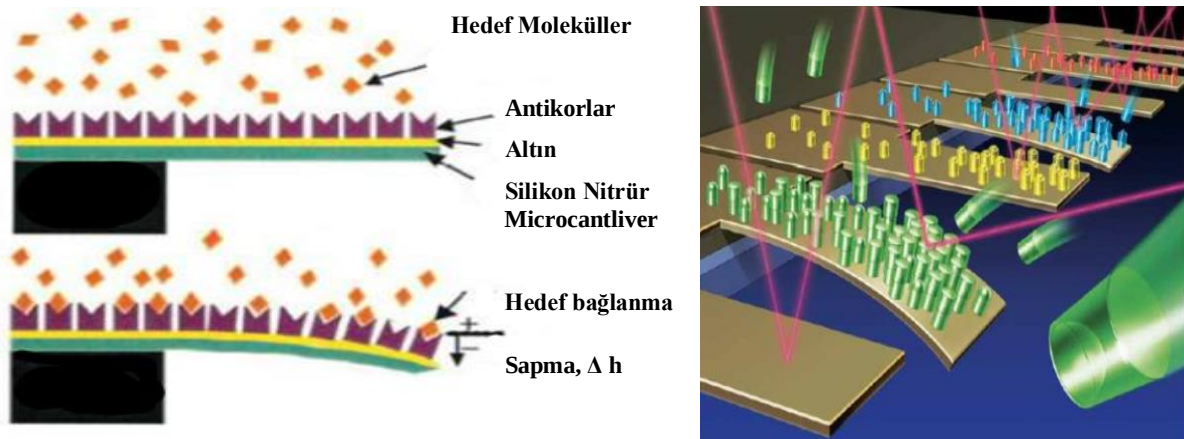
Şekil 2. 2. (a): Bruker MLCT tipi AFM probları, (b): Hücre uygulamalarında, Kolloidal AFM probları geniş kullanıma sahiptir (24).

2.3.2. Polimer bazlı konsol probu

Bir polimerik boncuk veya kolloid, kısmen polimer bazlı bir AFM probu elde etmek için uçsuz Si bazlı bir konsola manuel olarak eklenmektedir (Şekil 2.3b). Bu boncuk/kolloidin yarıçapı genel olarak $> 1 \mu\text{m}$ civarında olup Si bazlı bir ucunkinden > 100 kat daha büyüktür. Kolloid yapı hücreyi mekanik uyarılara karşı koruma eğilimindedir.

2.4. Mikro Konsol Yüzeyinin işlevselleştirmesi

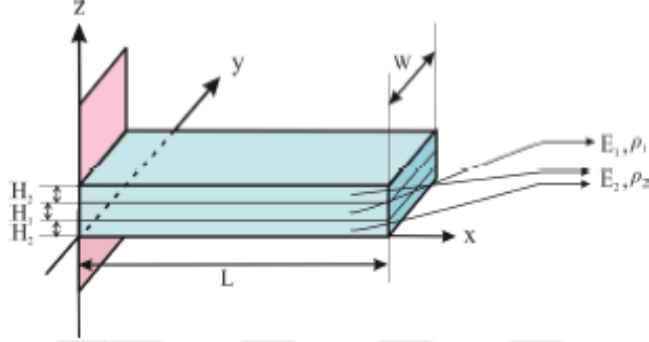
Konsol yüzeyinde biyoreseptörlerin immobilizasyonu, gerçekleştirilecek biyoanalizin kalitesini güçlü bir şekilde etkiler. Biyomolekül bağlanmasının etkinliği, hedeflerine erişilebilirliği ve spesifik olmayan bağlanma derecesi dikkate alınmalıdır. İmmobilizasyon işlemi sırasında biyolojik özelliklerde herhangi bir değişiklik olmamasına dikkat edilmelidir. Kontrollü kimyasal işlevsellik, kendinden montajlı tek katmanlar (SAM'ler) kullanılarak gerçekleştirilebilir. Altın ve diğer soy metaller için kükürt bileşiklerinin (tiyoller, tiyoeterler ve disülfidler) güçlü afinitesi olduğundan dolayı nanomekanik biyosensör uygulamalarında oldukça geniş kullanım alanına sahiptir (25). AKM problemlerinin konsol yüzeyini genellikle lazer ışınının yansımaları artırmak içinde ince bir altın tabakası (20–100 nm) ile kaplanmaktadır. Böylece, Tiyol-SAM'ler kullanılarak altın yüzeyler üzerinde hem DNA'nın hem de proteinlerin immobilizasyonu sağlanabilmektedir.



Şekil 2. 3. Organik çok tabakalar kullanarak kovalent immobilizasyon şeması (26) (27)

2.5. Dikdörtgen Bimorf yapıda Mikro Konsolun Rezonans Frekansı

Bir yer değiştirme işlevi, herhangi bir geometrik kısıtlamayı ihlal etmiyorsa ve sistemin yer değiştirmiş biçimini herhangi bir süreksizlik olmadan temsil edebiliyorsa kabul edilebilir. Şekil 2.5, uzunluk L , genişlik W , yoğunluk ρ_1 ve ρ_2 , kalınlık H_1 ve H_2 , kesit alanı atalet momenti I_1 ve I_2 ve Young'ın modülü E_1 ve E_2 olan bimorf piezoelektrik dikdörtgen bir konsolun yapısını göstermektedir.



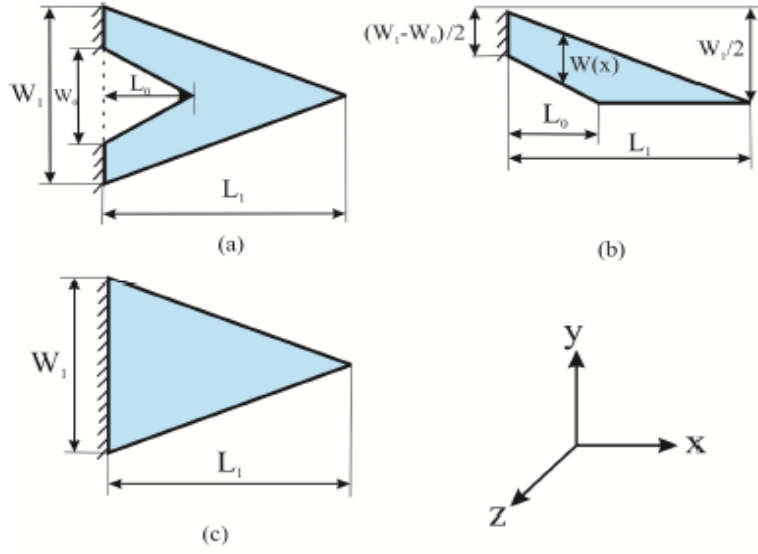
Şekil 2. 4. Dikdörtgen bir konsol kirişin şematik çizimi (28).

Dikdörtgen Bimorf mikro konsolun rezonans frekansına (f_{rect}) Denklem 2.5'den ulaşılır (28).

$$f_{rect} = \frac{\sqrt{385}}{11\pi L^2} \sqrt{\frac{\frac{E_1 H_1^3}{12} + \frac{2E_2 H_2^3}{3} + \frac{E_2 H_2 H_1^3}{2} + E_2 H_1 H_2^3}{\rho_1 H_1 + 2\rho_2 H_2}} \quad \text{Denklem 2.5}$$

2.6. Bimorf üçgen V-şekilli konsolların rezonans frekansı

Şekil 2.6 (a), tipik bir bimorf üçgen V-şekilli konsolun, sırasıyla L_0 ve L_1 uzunluklarına ve W_0 ve W_1 genişliklerine sahip iki bimorf üçgen konsol arasındaki fark olarak ele alınabileceğini göstermektedir. Bimorf üçgen V-şekilli konsolun ayna simetrisinden dolayı, Şekil 2.6 (b)'de gösterildiği gibi dörtgen bir konsol olan sadece yarısını analiz etmemiz gerektiği (28) ile kolayca doğrulanabilir.



Şekil 2.5. (a) bimorf V-şekilli konsolun (b) bimorf V-şekilli konsolun yarısı (c) üçgen konik konsolun şekli ve boyutu (28)

Denklem 2.6’da hesaplama kolaylığı olması amacıyla iki bimorf konik konsolun genişlik oranını u ve uzunluk oranını v tanımlanmaktadır;

$$u = \frac{W_0}{W_1}, v = \frac{L_0}{L_1} \quad \text{Denklem 2.6}$$

Bimorf üçgen V-şekilli konsolun rezonans frekansı Denklem 2.7’den elde edilmektedir.

$$f(W(x)) = \frac{\sqrt{210}}{\pi L_1^2} \sqrt{\frac{\frac{E_1 H_1^3}{12} + \frac{2E_2 H_2^3}{3} + \frac{E_2 H_2 H_1^3}{2} + E_2 H_1 H_2^3}{\rho_1 H_1 + 2\rho_2 H_2}} g(u, v) \quad \text{Denklem 2.7}$$

Burada $g = (u, v)$, Rezonans frekansı ile u ve v oranları arasındaki ilişkiyi temsil etmek için bir karakteristik fonksiyon olarak tanımlanmıştır;

$$g(u, v) = \sqrt{\frac{3 - 6uv + 4uv^2 - uv^3}{49 - 84uv^5 + 40uv^6 - 5uv^7}}$$

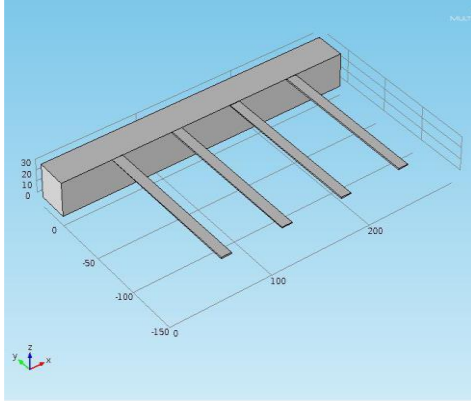
$$u \in [0,1], v \in [0,1] \quad \text{Denklem 2.8}$$

$g = (u, v)$ maksimum değeri olan 0.2474'ye ($\frac{\sqrt{3}}{7} \approx 0.2474$) $v = 0$ veya $v = 1$ veya $u = 1$ olduğunda ulaşır (28). Bu, bimorf V-şekilli konsolun yalnızca $L_0=0$ veya $L_0=L_1$ veya $W_0=0$ olduğunda maksimum rezonans frekansına ulaştığı anlamına gelir.

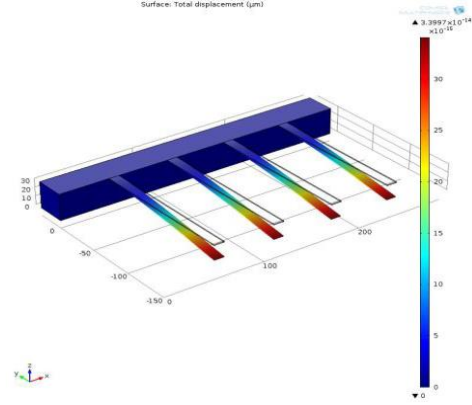
Tezin dördüncü bölümünde, bu çalışmada tasarlanan V tipi ve Dikdörtgen mikro konsol biyosensörlerin simülasyon sonuçları Denklem 2.5 ve Denklem 2.7 ile karşılaştırılmıştır.

2.7. Hastalık Tespitinde Mikro konsol tabanlı Biyosensör Uygulamaları

Mikrokonsollar, hızlı sonuç verdiği için çeşitli hastalık teşhislerinde kullanılması amacıyla çalışmalar yürütülmüştür (29) (30) (31). Örneğin, Sowmya Selvaraj ve ark. tarafından, HIV antijenlerinin tespiti için nano ölçekli bir konsol dizisinin sensör olarak modellenmesi gerçekleştirilmiştir. Çalışma, malzemeleri ve konsolun geometrik ölçüsünü optimize ederek p24 antijen bazlı HIV tespiti için konsol dizi sensörünün optimum performansını elde etmek için sonlu eleman yöntemini kullanmıştır. Bu çalışmada, sabit uzunlukları 150 μm , genişliği 10 μm ve kalınlığı 1000 nm olan dört kırıktan oluşan bir konsol dizisi tasarlanmıştır (Şekil 2.7.a) . Konsolların yüzeyinin p24 antikoruyla işlevselleştirilmesi için, giriş olarak 10 molekül p24 antikor ağırlığına eşdeğer bir basınç ($3.146167743 \times 10^{-12}$ Pa) değeri tanımlanmış, ve konsolda z ekseninde sapma gözlenmiştir. Çalışmada, antijenlerin, konsolun tüm antikorlarıyla etkileşime girdiği varsayılarak, konsolların yüzeyine, 10 antijen molekülünün ve 10 antikor molekülünün ağırlığına eşdeğer bir toplam basınç ($5.749892771 \times 10^{-12}$ Pa) değeri daha uygulanmıştır. Konsol yüzeyinde basınçtan dolayı oluşan stress ve yer değiştirme Şekil 2.7. b de görülmektedir. SiO_2 konsol dizisinin antikorların immobilizasyonu üzerine bu yer değiştirmesi, 10 antijen ve 10 antikorun basınç eşdeğerinin neden olduğu sapma miktarıdır. Tasarlanmış bu nano konsol dizisi sensörünün, geleneksel laboratuvar p24 antijen testinden yaklaşık 109 kat daha yüksek hassasiyete sahip olduğu raporlanmıştır. (32)



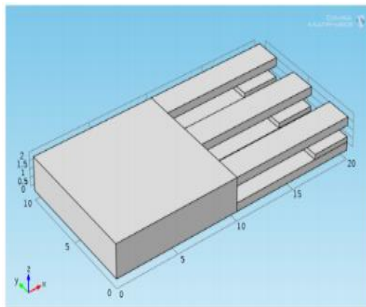
(a)



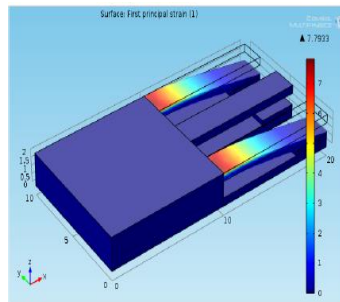
(b)

Şekil 2. 6. (a) MEMS konsol dizi sensörünün yapısı, (b) SiO₂ konsol dizisinin antikörlerin immobilizasyonu üzerine yer değiştirmesi (32).

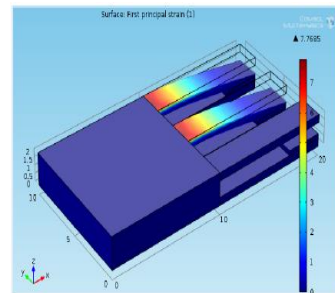
Diğer bir çalışmada Sushmita Katti ve ark. (33) tarafından, kan grubunun belirlenmesine yönelik MEMS tabanlı bir sensör tasarımı üzerine çalışılmıştır. Konsol yapısının tasarımı, 2,4-Dinitrofenol kaplı bir algılama katmanına sahiptir, ve kan örneği bu katmanla temas ettiğinde, pıhtılaşmaya neden olarak konsol yüzeyinde gerilim oluşturur. Bu yüzey gerilimi, üçlü konsol kırımlarının yüzeyinde pıhtılaşmaya yol açan antijen ve antikörlerin kimyasal ve biyolojik reaksiyonları sonucu meydana gelmektedir. Konsol üzerindeki yüzey gerilimi, konsol kırımlarının bükülmesini sağlar ve bu deformasyon RH faktörü ile birlikte kan grubunun belirlenmesini sağlar .



(a)



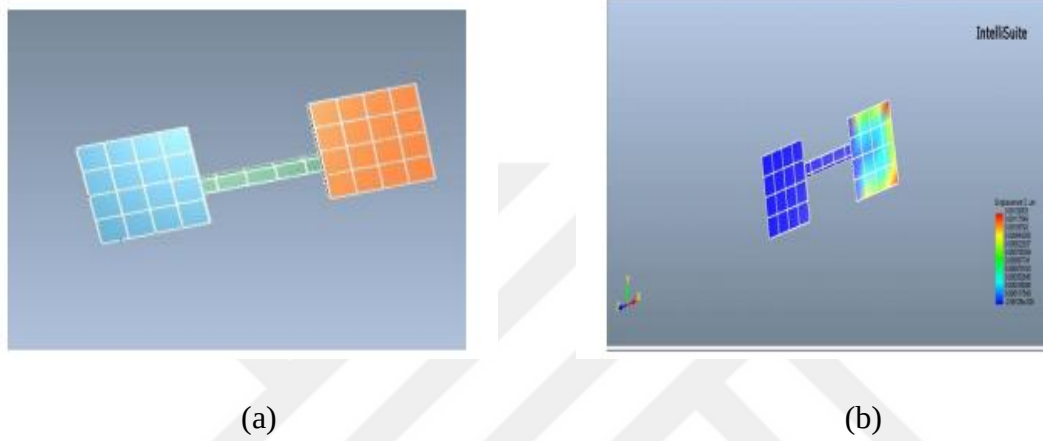
(b)



(c)

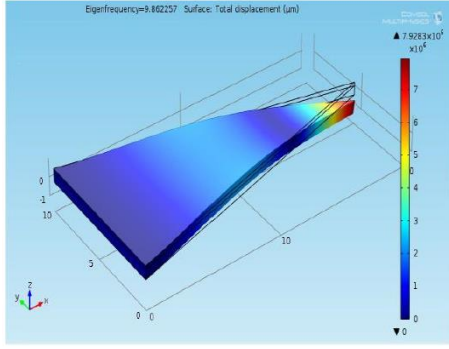
Şekil 2. 7. (a) Konsol dizaynı 3 kırımlı halinde, (b) A + kan grubu, (c) B + kan grubu tayini (33)

Başka bir çalışmada da, K. Beulah Sujan ve ark. (34) tarafından, İki konsol kirişli bir Mikro sensör, birden fazla hastalığı tespit etmek için tasarlanmıştır. Mikro sensörde sağ ve sol kirişler Silikon Nitrür ile kaplanmıştır. Sol kirişe, kronik böbrek hastalığı numunesi ve ilgili antijeni 28 KDa basıncıyla uygulanır. Kirişin kütledeki artış nedeniyle, stres oluşur ve sapma meydana gelir. Benzer şekilde sağ kirişede, mavi bebek hastalığı örneği üzerine 57 KDa antijeni uygulanmıştır.

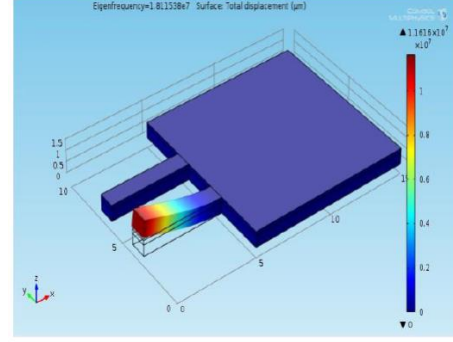


Şekil 2. 8. Önerilen Sensörün Geometrisi (a) Konsol kirişi (b) yer değiştirme (34)

Saranya R. ve ark. (30) tarafından yapılan bir diğer biyosensör tasarımı da, verilen kan örneğindeki Mycobacterium tuberculosis'in tanımlanması için MEMS mikro konsol tasarımı yapılmıştır. Bu çalışmada, mikro konsolun yüzeyi, tüberküloz (TB) antijen 85 kompleksine özgü TB antikorları ile kaplanmıştır. Üzerine tüberküloz bakteri içeren kan örneği yerleştirildiğinde, TB antijenleri ile mikro konsolun yüzeyindeki antikorlar arasında biyokimyasal reaksiyonlar meydana gelir. Böylece, tüberkülozun tespiti mikro konsoldaki sapma üzerinden gerçekleştirilmektedir. Mevcut geleneksel tüberküloz tespit yöntemleri ile karşılaştırıldığında, bu tip bir MEMS biyosensör, tüberkülozun analizini ve tespitini çok kolay ve kesin hale getirebileceği öngörülmektedir.



(a)



(b)

Şekil 2. 9. (a) Üçgensel mikrokonsol üzerinde yapılan sonuçlar (b) Pi şeklinde mikrokonsol üzerinde yapılan sonuçlar (30)

Kurmendra ve ark. (31) tarafından yapılan bir diğer biyosensör tasarımı, Sıtma protozoan parazitlerinin tespiti için MEMS mikro konsol tasarımı yapılmıştır. Bu çalışmada, Sıtma protozoan parazitlerinin tespiti için Sonlu elemanlar yöntemine dayalı tasarlanmış bir model sunulmuştur. Çalışmada, mikro konsollu biyosensör için E şekilli bir model, özellikle Sıtmanın tespiti için COMSOL Multiphysics kullanılarak tasarlanmıştır. Au (Altın), Cu (Bakır), Si (Silikon) ve Pt (Platinyum) gibi mikro konsol malzemeleri, cihaz yapısının uygun optimizasyonu ile Sıtma protozoanını algılamak için kullanılmıştır. Bu protozoan biyomoleküller ve metal kaplamalara bağlı değişen ısıma uzunlukları aracılığıyla uygulanan kuvvet nedeniyle, konsol yapılarda stres ve yer değiştirme gerçekleşmiştir. Ayrıca, tasarlanan yapı, biyosensör için mevcut olan farklı ışın malzemeleri için analiz edilmiş ve sunulan malzemeler arasında en iyi hassasiyet profiline sahip olduğu için altının sıtma protozoan parazitlerinin tespiti için en uygun malzeme olduğu raporlanmıştır. Sonuçlar analitik yaklaşımla da uyumlu olduğu doğrulanmıştır.

3. MELANOM TESPİTİ İÇİN MEMS TABANLI BİYOSENSÖR TASARIMI VE ANALİZİ

Bu çalışmamızda AKM mikrokonsol yapıları, melanom biyobelirteçi olan MITF proteinin tespitinin sağlanması amacıyla, yüzeyi Anti-MITF (D5) antikoruyla işlevselleştirilerek, konsolda gerçekleşen kütle değişiminden ve konsolun rezonans frekansında gerçekleştirdiği kayma miktarından hesaplanması amaçlanmıştır. Bu bölümde, tasarımı yapılan V tipi ve dikdörtgen tipi AKM konsol biyosensörünün simülasyon parametrelerinden bahsetmeden önce Melanom hakkında genel bilgi verilecektir.

3.1 Melanom Hakkında Genel Bilgi

Cilt kanserinin ortaya çıktıkları hücreye ve klinik davranışına göre Bazal Hücreli Karsinom, Skuamöz Hücreli Karsinom ve Melanom olmak üzere 3 türü bulunmaktadır. Dolayısıyla cilt kanserlerini melanom ve non-melanom olmak üzere iki kategoride incelememiz mümkündür. Her yıl dünya çapında ortalama 2 ila 3 milyon bireyde non-melanom cilt kanseri ve 132.000 bireyde melanom cilt kanseri meydana gelmektedir. Melanomlar genellikle kutanöz melanositlerden kaynaklansa da genital ve gastrointestinal mukoza, ağız boşluğu ve göz gibi mukozal yüzeylerden de kaynaklanabilir (35). Kutanöz ve ektrakütanöz malign melanom, en ölümcül cilt kanserlerinden biridir ve cilt kanserine bağlı ölümlerin yaklaşık %75'ini oluşturur (36) (37). İleri evre melanomda genel sağ kalım oranı, halihazırda mevcut olan terapötik yöntemlere rağmen hala son derece düşüktür. Erken tanı ve etkili tedavi, daha iyi sonuç ve uzun vadeli sağ kalım için kritik öneme sahiptir. Beş yıllık sağ kalım oranının lokalize erken evre malign cilt kanserleri için %99 olduğu ancak metastaz sonrası sağ kalım oranının %15'e kadar düştüğünü göstermektedir.

Cilt kanserlerinin çoğunun hastanın kendisi ya da bir yakını tarafından fark edildiği bilinmektedir (38). ABCDE (Asimetri- Border (sınır)- Color (renk)- Diametre (çap)- Evolving (gelişim)) skalası ile hastalar cilt üzerinde meydana gelen değişiklikleri zaman içerisinde fark eder. Ne yazık ki bu süreç genellikle hastalığın ileriki evrelerine (genellikle metastaz sürecine) denk gelmektedir. Mevcut tanı teknikleri arasında non- invaziv bir yöntem olan dermoskopi, tüm vücut görüntüleme, X-ışını görüntüleme ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) yer alırken mikroskobik düzeyde ise, cilt kanseri çeşidi ve kanser evresini öğrenmek amacıyla biyopsi işlemleri yer almaktadır (39) . Biyopsi, cildin çıkarılmasını ve hücrelerin malign ya da bening olup olmadıklarının tespitinde sıklıkla kullanılan konvansiyonel bir yöntemdir. Fakat bu yöntem genellikle lezyonların yayılmasına neden olur. Sağlıklı hücrelere zarar vermesi ve

metastazı teşvik etmesi nedeniyle tehlikeli olma eğilimi göstermektedir. Makroskobik ve mikroskobik düzeyde kanser görüntülemeye kullanılan bu yöntemler radyasyon içermesi, kloströfobik kişiler için elverişsiz olması, kontrast madde kullanımına bağlı gelişen anafilaktik reaksiyonlara sebebiyet vermesi, zaman alıcı, pahalı ve uzmanlık gerektirmesi gibi birtakım dezavantajlar içermektedir. Melanom hücre tanı yaklaşımlarına ek olarak melanom biyobelirteçlerinin tespiti, kanser tanı ve tedavisi yaklaşımlarına yeni bir bakış kazandırmıştır.

Biyobelirteçler, anormal veya normal bir sürecin veya herhangi bir hastalığın veya durumun göstergesi olan dokularda, kanda ya da diğer vücut sıvılarında (idrar, serum, beyin omurilik sıvısı vb) bulunan, RNA, DNA ya da protein (antikor, tümör baskılayıcı, onkojen veya hormon) içeren biyolojik moleküllerdir (40) (41) . Bu özellikleri nedeniyle biyobelirteçler erken tümör teşhisi, kanserin tedaviye yanıtını belirleme, hastalığın ilerlemesini izleme ve doğru tedavi öncesi evreleme için çok önemlidir (42) . Melanomun histolojik tanısında bazı primer (MITF, S100 protein ailesi, SM5-1, CSPG4/HMW-AA) ve metastatik (Melan -A, MITF, Tirozinaz, SM5-1) biyobelirteçler sıklıkla kullanılmaktadır.

Melanom için yaygın olarak kullanılan belirteçler (S100, Melan-A ve Pmel) bazı durumlarda serolojik tayin yöntemlerinde negatif yanıt vermektedir. Bu tarz vakalarda, kritik teşhis zorlukları öne çıkmaktadır. Çalışmalarda Mikroftalmi Transkripsiyon Faktörünün (MITF) yüksek hassasiyete (yaklaşık %100) ve metastatik melanom için özgüllüğe sahip olduğu görülmektedir (43) (44). MITF embriyoda melanosit gelişimi ve doğum sonrası bu melanositlerin hayatta kalması için kritik bir nükleer transkripsiyon faktörüdür, ayrıca melanosit gelişimi ve farklılaşmasının bir düzenleyicisi olup, melanoblast farklılaşması için gerekli olduğu bilinmektedir. C5 monoklonal antikoru hem insan hem fare MITF ‘yi tanıırken, D5 monoklonal antikoru sadece insan MITF’sini tanımaktadır (42) (45). Birincil kutanöz melanositik ve nonmelanositik neoplazilerde, MITF kaynaklı kanser tespitine yönelik oldukça sınırlı çalışma yapıldığı literatürde görülmektedir.

Melanom tanısında kullanılan serolojik yöntemlerin, doku biyopsisi ve tıbbi görüntüleme yöntemlerinin belirtilen dezavantajları göz önünde bulundurulduğunda, erken tanı olanağı sağlayan biyobelirteç teşhisi için basit ve düşük maliyetli, bakım noktası tanı cihazlarına ihtiyaç her geçen gün artmaktadır

Bu çalışmada, melanom biyobelirteçi olan MITF proteinin tespitinin sağlanması için bir AKM mikro konsol yüzeyini Anti-MITF (D5) antikoruyla işlevselleştirilerek, konsolda gerçekleşen kütle değişimin, konsolun rezonans frekansında gerçekleştirdiği kayma miktarından hesaplanması amaçlanmıştır. Bu amaçla ticari bir AKM konsolunun boyutları, malzeme

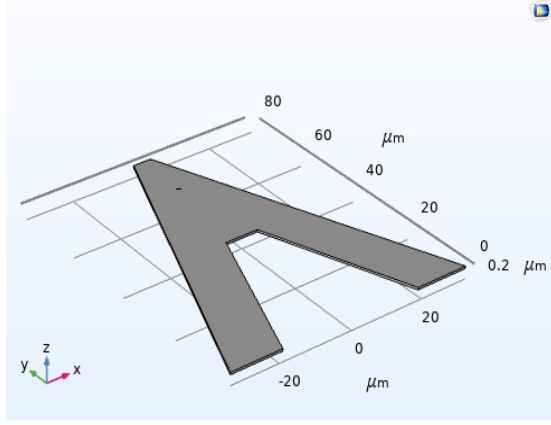
özellikleri birebir alınarak sonlu elemanlar modellemesi yapılan bir programda yüzeyinin işlevselleştirilmesi sağlanmıştır (24). Sensör tasarımının tüm ayrıntıları tezin 3.2 konsol geometrisi ve yüzeyinin işlevselleştirilmesi bölümünde açıklanmıştır.

3.1. Konsol Geometrisi ve Yüzeyinin İşlevselleştirilmesi

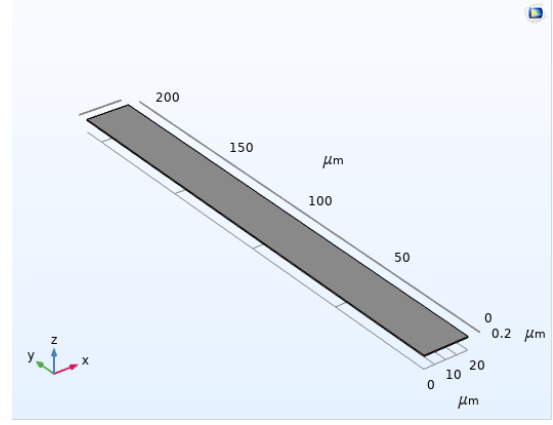
Bu mevcut çalışma, malzemeleri ve konsolun geometrik ölçüsünü optimize ederek MITF antijen bazlı Melanom tespiti için konsol dizi sensörünün optimum performansını elde etmek için sonlu eleman yöntemini göstermektedir. Konsol tabanlı dizi sensörleri geliştirmek için MEMS için ticari bir sonlu elemanlar analiz aracı olan COMSOL Multiphysics 5.5 kullanılmıştır.

Mikro konsol, bir ucundan sıkılmış basit bir mekanik yapıdır. Mikro konsolun yüzeyindeki belirli bir algılama elemanının kaplanması ile sensör olarak kullanılabilir. Bu çalışmada, mikro konsolun yüzeyi, MITF antijenine özgü olduğu bilinen D5 monoklonal antikörleri (anti-MITF) ile kaplanmıştır. D5 monoklonal antikörleri üzerine MITF antijeni içeren bir serum (örneğin melanomlu hastadan alınan bir kan örneği) ilave edildiğinde MITF antijeni ile D5 antikoru arasında birbirlerine duydukları affinite nedeniyle biyokimyasal reaksiyonlar meydana gelerek antijen-antikör kompleksi oluşur. Çalışmada, konsol üzerinde oluşan bu antijen-antikör kompleksi modellenmiştir. Oluşan bu kompleks, konsol üzerinde bir stres ve gerilim meydana getirir. Sonlu elemanlar modeli kullanılarak yüzeyin işlevselleştirilmesi ve oluşan stres ve rezonans değişiminin hesaplaması gerçekleştirilmiştir.

Mikro konsol tasarımında, öncelikle, sabit uzunlukları 80 μm , genişliği 60 μm ve kalınlığı 0,2 μm olan V tipi (Şekil 3.1a), ve uzunlukları 210 μm , genişliği 20 μm ve kalınlığı 0,2 μm olan dikdörtgen (Şekil 3.1b) konsolun geometrisi tanımlanmıştır.



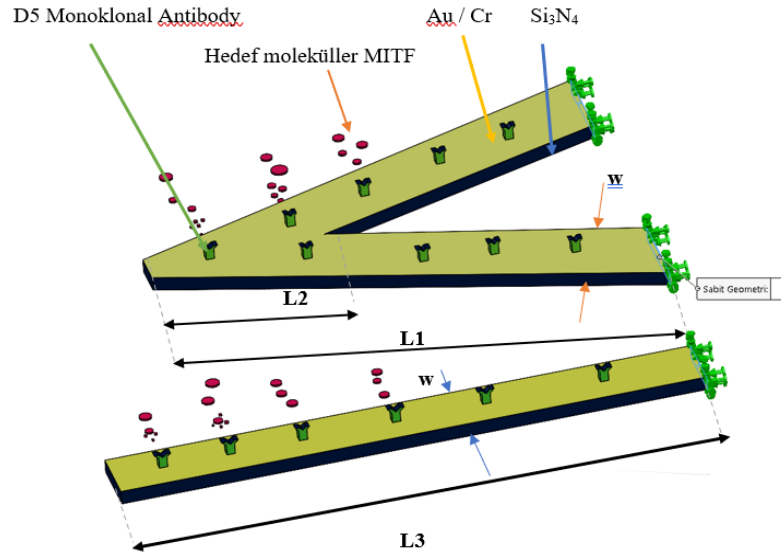
(a)



(b)

Şekil 3. 1. (a) Bimorf V tipi konsolun Sonlu elemanlar modeli yazılımı kullanılarak tasarımı. (b) Tasarlanan dikdörtgen mikro konsolun COMSOL Multiphysics yazılımı kullanılarak Geometrik çizimi

Materyal tanımlamasında, V tipi ve dikdörtgen AKM konsolunda alt tabaka olarak Si_3N_4 malzemesi kullanılmıştır. Alt tabakanın üzerinde Anti-MITF (D5) immobilizasyonun sağlanması için 50 nm kalınlığında altın tabakası tanımlanmıştır. Modellemede tanımlanan malzemelerin yoğunluk (ρ : Density), Elastisite Modülü (E : Young Modulus), ve Poisson oranları (ν : Poisson Ratio) gibi parametreleri Tablo 2’de verilmiştir.



Şekil 3. 2. V tipi ve Dikdörtgen mikro konsolun modellemesi

Her konsolun yüzeyinin, 100 molekül D5 antikoruyla işlevselleştirildiği varsayılmaktadır. Giriş olarak 100 molekül antikor ağırlığına eşdeğer bir basınç (4.50512×10^{-11} Pa) tanımlanmıştır. Daha sonra her bir antijen-antikor çiftine karşılık, 100 antijen molekülünün ve 100 antikor molekülünün MITF+D5=>MITFD5 ağırlığına eşdeğer bir toplam basınç (9.612451×10^{-11} Pa) uygulanmıştır. Bu çalışmada, MITF antijenin Molekül ağırlığı=59 kDa ve D5 antijeninin molekül ağırlığı=52 kDa olarak alınmıştır (46). Modellemede, antijenlerin, konsolun tüm antikorlarıyla etkileşime girdiği varsayılmaktadır. Bu nedenle yer değiştirme, ve rezonans frekansında görülen sapma 100 antijen ve 100 antikorun basınç eşdeğerinin neden olduğu sapma ile aynı olacaktır. Eşdeğer toplam basıncın hesaplaması aşağıdaki gibi yapılmıştır.

Eşdeğer toplam basıncın hesaplaması:

$$F=m \cdot a$$

$$M_{D5} = 52\text{kDa} \cdot 1.6605 \times 10^{-24} = 8.6346 \times 10^{-23} \text{ kg}$$

$$M_{MITF} = 59\text{kDa} \cdot 1.6605 \times 10^{-24} = 9.79695 \times 10^{-23} \text{ kg}$$

$$F_{D5} = 8.6346 \times 10^{-23} \text{ kg} \cdot 9.81 = 8.4705 \times 10^{-22} \text{ N}$$

$$F_{MITF} = 9.79695 \times 10^{-23} \text{ kg} \cdot 9.81 = 9.6108 \times 10^{-22} \text{ N}$$

$$P = F / A$$

Model de konsol yüzey alanları, $A = 188 \times 10^{-11} \text{ m}^2$ olarak alınmıştır. Bu durumda, eşdeğer basınç;

$$P_{D5} = F_{D5} / \text{Alan} = 8.4705 \times 10^{-22} / 188 \times 10^{-11} = 4.5055 \times 10^{-13} \text{ N/m}^2$$

$$P_{MITF} = F_{MITF} / \text{Alan} = 9.6108 \times 10^{-22} / 188 \times 10^{-11} = 5.1121 \times 10^{-13} \text{ N/m}^2$$

$$F_{D5} + F_{MITF} = 1.80813 \times 10^{-21} \text{ N}$$

$$P_{D5} + P_{MITF} = 9.6176 \times 10^{-13} \text{ N/m}^2 = 1 \text{ tane antikor ve antijen immübilizasyonunun basıncı}$$

100 tane antijen ve antikor varsayımı gerçekleştiğinden;

$100 \times 9.6176 \times 10^{-13} \text{ N/m}^2 = 9,6176 \times 10^{-11}$ olarak hesaplanmıştır. Silikon ve altın malzemeden yapılan V tipi ve Rektangular mikro konsola $9.6176 \times 10^{-11} \text{ Pa}$ giriş basıncı uygulandığında ortaya çıkan yer değiştirme miktarları tezin bulgular bölümünde Şekil 4.1 'de gösterilmiştir.

Tablo 1. V tipi ve dikdörtgen mikrokonsolun fiziki ölçüleri ve uygulanan basınç değerleri

Uzunluk	L1: 80 μm	L2: 40 μm	L3: 210 μm
Kalınlık	T _{konsol} : 0,2 μm	T _{gold} : 50 nm	T _{antibody} : 9 nm
Genişlik ve Basınç	w: 20 μm	P _{gold} : $2 \times 10^{-7} \text{ N/m}^2$	P _{D5} : $4.5052 \times 10^{-11} \text{ N/m}^2$ P _{D5+MITF} : $9.6176 \times 10^{-11} \text{ N/m}^2$

Modelde, alt tabakası Si_3N_4 tanımlı, V tipi ve dikdörtgen AKM mikrokonsolların yüzeyine 50 nm Altın tabakası antikorun yüzeye tutunması için tanımlanmıştır. Altın tabakasının üstüne PDMS tabakası, D5 antikor için hesaplanan basınç değerine karşılık, 9 nm yüksekliğinde antikor eşdeğerinde malzeme olarak tanımlanmıştır. D5 antikorunun yüksekliği 8,5 nm dir (47) (46). Tablo 2’de sonlu elemanlar analizi, Katı Fiziği arayüzünde malzemeleri tanımlarken kullanılan mekanik özellikler verilmektedir.

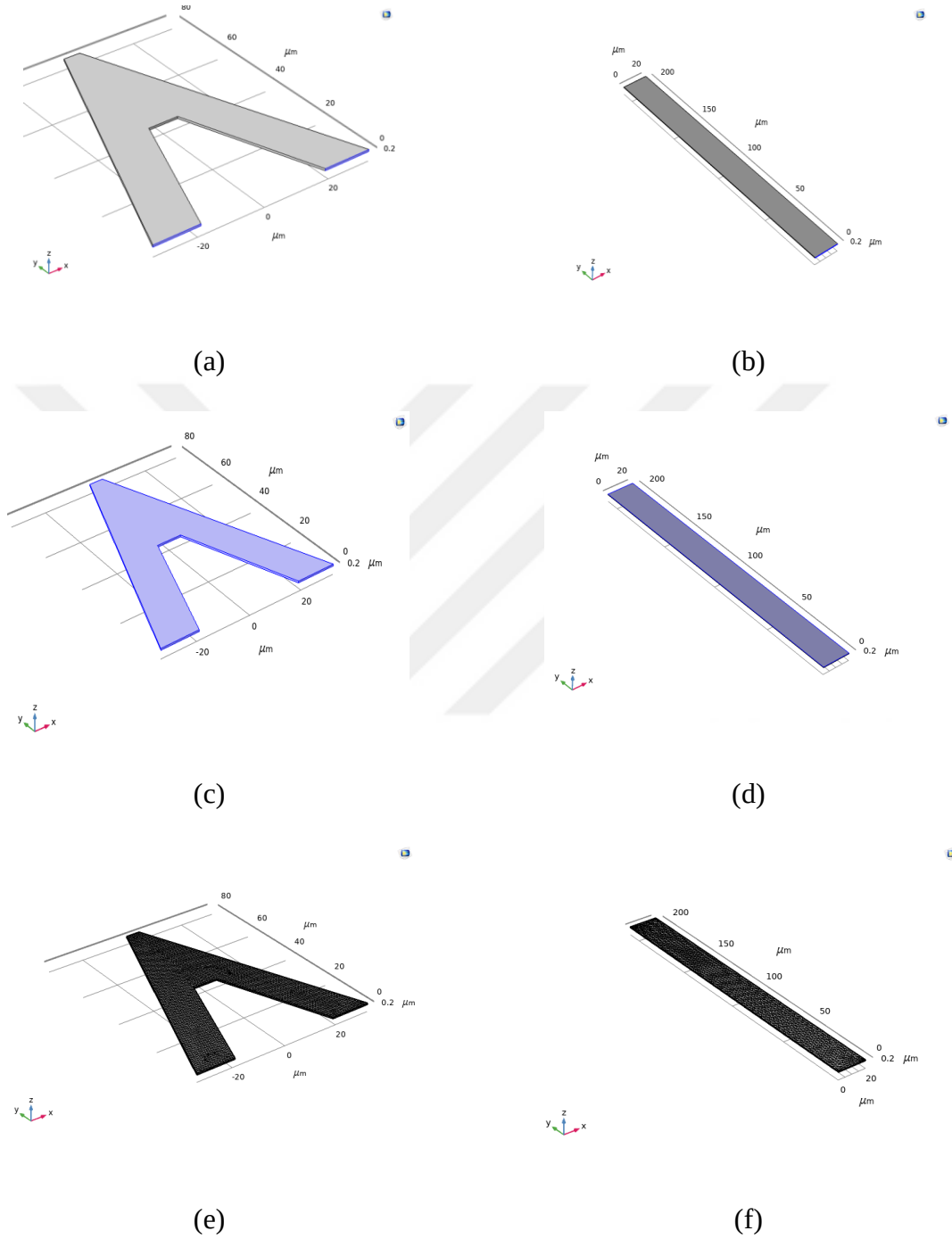
Tablo 2. Konsolda kullanılan Si_3N_4 , Altın ve PDMS malzemelerinin özellikleri

	Si_3N_4	Altın	PDMS
Yoğunluk	3100[kg/m ³]	19300[kg/m ³]	970[kg/m ³]
Elastisite Modülü	250e9[Pa]	70e9[Pa]	750[kPa]
Poisson Oranı	0.23	0.44	0.49

3.2. Sonlu Elemanlar Modelinin Oluşturulması

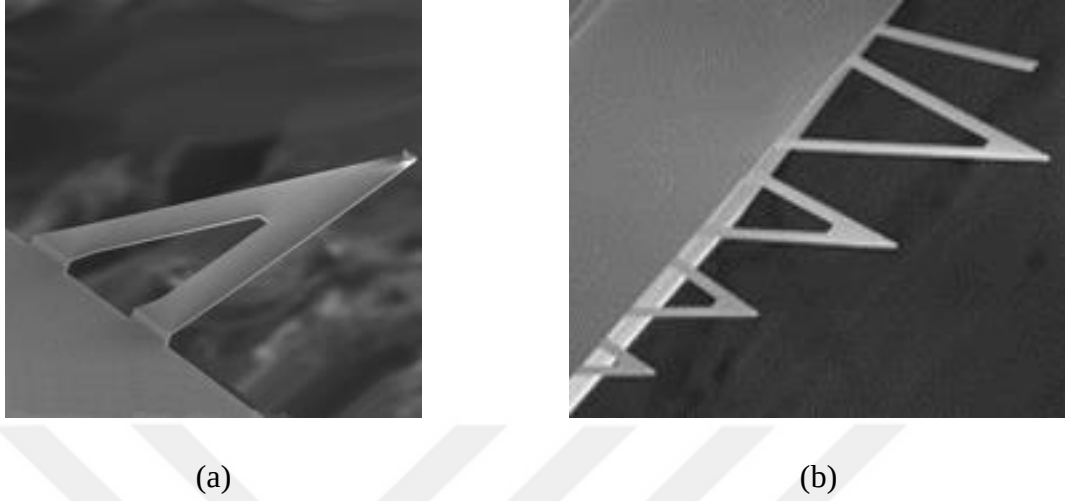
Mikrokonsol yüzeyinde antikor ve antijen immübilizasyonu sonucu gerçekleşecek olan frekans kayması ve yer değiştirmeyi hesaplayabilmek için Şekil 3.3 (a-b)’de görüldüğü üzere konsolların mavi ile belirtilen sınırları sabitlenmiştir. Mikro konsol üzerine x ve y eksenini 0’da , z eksenini yönünde $9.6176 \times 10^{-11} \text{ N/m}^2$ değerinde antikor ve antijen basınç ağırlığına sahip bir yük uygulanmıştır. Şekil 3.3 (c-d)’de yük uygulanan yüzeyler görülmektedir. AKM

mikrokonsol için mesh tipi olarak fizik kontrollü ağ (physics controlled mesh) uygulaması yapılarak, ince ağ (fine mesh) tanımlanmıştır, Şekil 3.3 (e-f)'de konsola uygulanan ağ yoğunluğu görülmektedir.



Şekil 3. 3. (a-b) Mavi ile belirtilen sınırlar sabitlenmiştir. (c-d) Mikro konsolların mavi ile belirtilen Altın kaplı üst yüzeyine $9.6142 \cdot 10^{-11} \text{ N/m}^2$ basınç uygulanmıştır. (e-f) Mikro konsola ince ağ (fine meshing) uygulaması yapılmıştır.

Bu mikrokonsollar, Bruker Firmasının AKM problemlerinden ScanAsyst-Fluid tip prob modeli (Şekil 3.4a) ve MLCT-B tipi (Şekil 3.4b de yer alan dikdörtgen prob) boyutlarından referans alınarak çizilmiştir. Şekil 3.4 'de referans alınan AFM mikro konsolları gösterilmektedir (24).



Şekil 3. 4. Referans alınan (a) ScanAsyst-Fluid AKM probu (48) ve (b) MLCT-B ve MLCT-F Fluid AKM probu modeli (24).

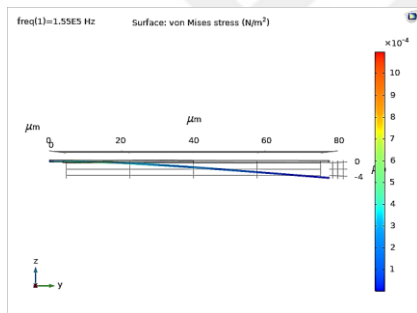
ScanAsyst-Fluid problemleri, Silikon Nitrür malzemeden üretilmiş olup, üst yüzeyinde 50 nm Altın kaplaması yer almaktadır. Konsolun nominal kalınlığı 0.6 μm olup, nominal uzunluğu 75 μm ve genişliği maksimum 15 μm olarak verilir. Konsolun yay sabitinin nominal değeri 0.7 N/m olup rezonans frekans aralığı frekansı 150 kHz ve 200 kHz arasında değişmektedir.

MLCT tipi problemleri de, Silikon Nitrür malzemeden üretilmiş olup, üst yüzeyinde 50 nm Altın kaplaması yer almaktadır. Altın katman, antikorların immobilizasyonunu sağlar ve Yüzey Plazmon rezonansı ile mikro konsol giriş saptanmasına yardımcı olur. Konsolun nominal kalınlığı 0.55 μm olup, nominal uzunluğu B tipi dikdörtgen mikrokonsol için 210 μm ve genişliği maksimum 20 μm olarak verilir. B tipi dikdörtgen konsolun yay sabitinin nominal değeri 0.02 N/m olup rezonans frekans aralığı frekansı 10 kHz ve 20 kHz arasında değişmektedir. Şekil 3.3 modellemesi yapılan V tipi ve dikdörtgen mikrokonsolların sonuçları, ScanAsyst-Fluid ve MLCT-B tipi problemlerin rezonans frekansı ile karşılaştırılacaktır.

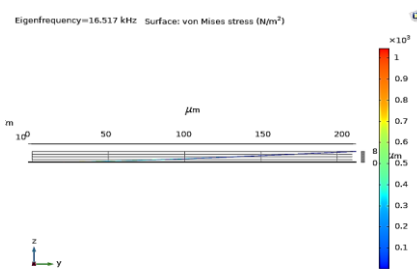
4. BULGULAR

4.1. Mikrokonsolların Yerdeğiştirme ve Frekans Kayma Değerleri

Bölüm 3.2’de detaylı açıklandığı üzere mikro konsol yüzeylerin işlevselleştirilmesi sırasında D5 antikorlarının Molar kütlesi 52 kDa olarak , antikorlara bağlanacak MITF antijeninin ise Molar kütlesi 59 kDa olarak tanımlanmıştır. Toplam reaksiyon sonucunda bir antikor-antijen çiftine karşılık konsol üzerinde 101 kDa bir kütle olacaktır. Toplam 100 adet antijen-antikor çiftine karşılık eşdeğer basınç tanımlaması tüm konsol yüzeyine tanımlanmıştır. Alt tabakası Silikon nitrür tanımlanan ve üstü 50 nm altın kaplı V tipi ve dikdörtgen mikro konsola $9.61 \cdot 10^{-11}$ Pa giriş basıncı (eşdeğer toplam basıncı) uygulandığında ortaya çıkan yer değiştirme miktarları ve oluşan stress (von Misses stres- N/m^2) Şekil 4.1 ’de gösterilmektedir. Yer değiştirme miktarları, konsolların en uç noktasından referans alınarak, V tipi Mikro konsol da gerçekleşen 4 μm yer değiştirme (Şekil 4.1a) ve dikdörtgen Mikro konsol da gerçekleşen 8 μm yer değiştirme (Şekil 4.1b) olarak hesaplanmıştır.



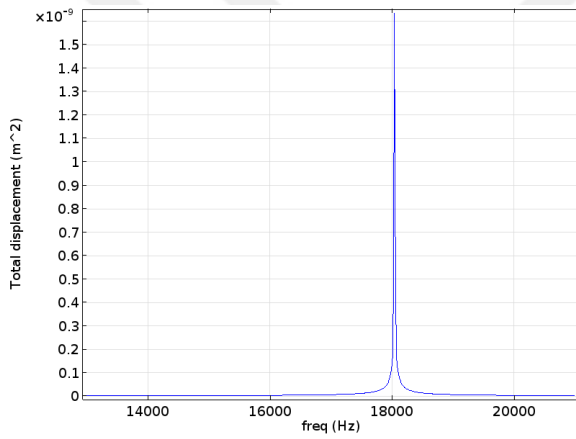
(a)



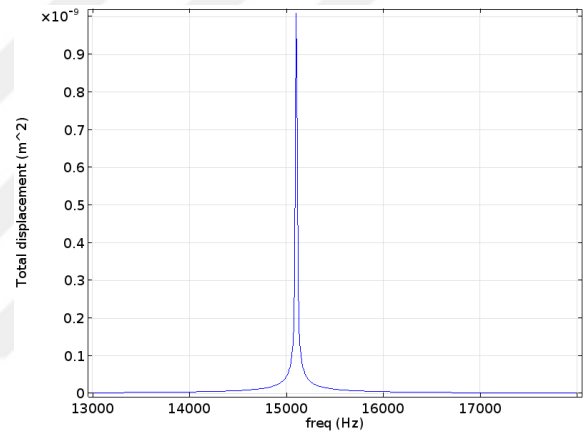
(b)

Şekil 4. 1 (a) V tipi Mikro konsol da gerçekleşen 4 μm yer değiştirme , (b) Dikdörtgen Mikro konsol da gerçekleşen 8 μm yer değiştirme.

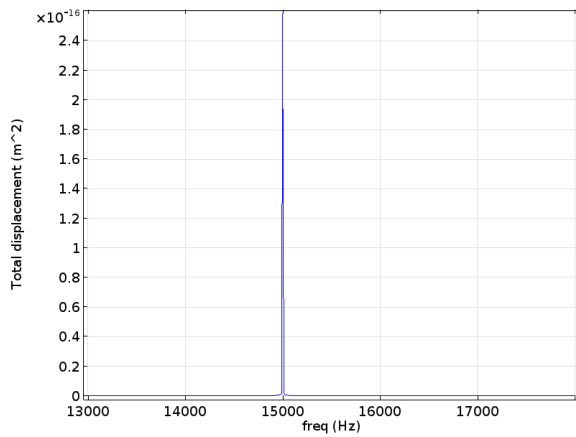
Mikrokonsolun frekans değerlerinin elde edilebilmesi için, Comsol Multifizik programı ile tasarlanmış olan V tip mikrokonsol ve Dikdörtgen tip mikro konsolun tasarım kısmı methodlar bölümünde detaylı olarak açıklandı. Bulgular kısmında ise Antijen ve antikor bağlanması sonucu konsol üzerinde gerçekleşecek yer değiştirmeler ve rezonans frekanslarının elde edilebilmesi için programın çalışma (Study) bölümünde Frekans alanında (Frequency Domain) konsolun üzerine etki eden kütle ile frekans birimi ve frekans aralığı seçimi yapıldı. Yapılan bu seçimlerle frekansın kaç birim aralıkta sonuç vermesini, frekans değerinin hata olasılığının minimum düzeye indirgenmesi ve maximum sonuç elde edilmesi sağlanmıştır. Elde edilen sonuçlarda konsol üzerinde artan kütle etkisi ile gerçekleşen yer değiştirmeler, özfrekans değerleri ve modları, gerilimler (von Misses Stress), ve artan kütle etkisiyle gerçekleşen (Denklem 2.1,2.2 ve 2.4) rezonans frekansındaki kayma sonuçları yer almaktadır.



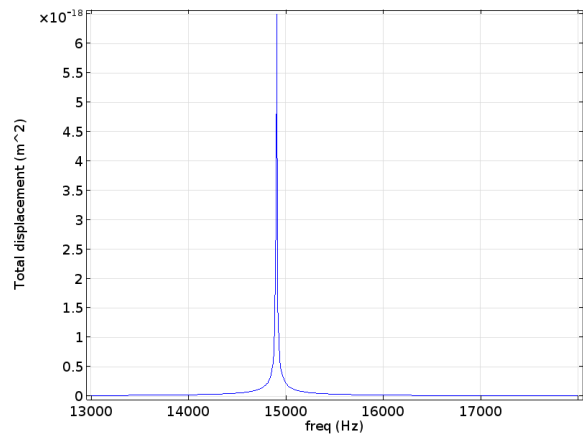
(a) Si_3N_4 (0.5 μm), 18.040 kHz



(b) Si_3N_4 +Altın (50 nm), 15.1 kHz



(c) Si_3N_4 +Altın+D5, 14.980 kHz



(d) Si_3N_4 +Altın+D5+MITF, 14.910 kHz

Şekil 4.2. Dikdörtgen tipi mikro konsol üzerine uygulanan sırasıyla Altın eklenmesi (b) , Antikor (c) ve Antijen-Antikor (d) immübilizasyonu sonucu rezonans frekansta gerçekleşen kayma

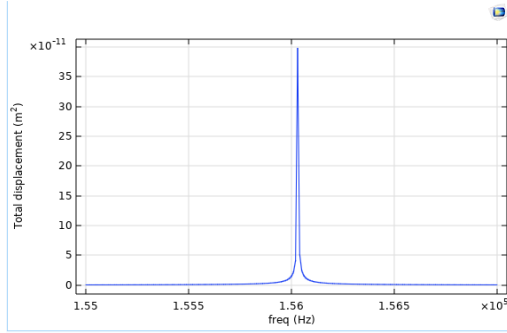
Sonlu Elemanlar Analizi ile simülasyon sonuçları gösterilmiştir. Dikdörtgen mikrokonsolun Rezonans frekansında gerçekleşen kayma değerleri, konsolun üzeri altın (Şekil 4.2b) kaplandığında elde edilen grafik, altın üzerine antikorların (Şekil 4.2c) bağlanması ile elde edilen ve antijen-antikorların (Şekil 4.2d) immobilizasyonu sonucu elde edilen grafik gösterilmiştir. Tablo 3. Dikdörtgen mikrokonsolda rezonans frekansında gerçekleşen kayma değerlerini vermektedir. Kalınlığı 0.5 μm olan Si_3N_4 dikdörtgen mikro konsolun rezonans frekans değeri 18.040 kHz bulunmuştur. 50 nm altın kaplandığında, frekans 15.100 kHz değerine kaymakta olup Tablo 5'te (24) yer alan Bruker-MLCT-B tipi referans probun belirtilen nominal rezonans frekansı (10-20 kHz) aralığında bulunmuştur. Altın üzerine MITF antijenine özgü olduğu bilinen D5 monoklonal antikorları (anti-MITF) ile kaplanması amacıyla, giriş olarak 100 molekül antikor ağırlığına eşdeğer bir basınç (4.50512×10^{-11} Pa) tanımlanmıştır. Bu durumda frekans değeri 14.980 kHz'e kaymıştır. Rezonans frekansında görülen bu kayma miktarı 100 antikorun basınç eşdeğerinin neden olduğu sapmadan dolayı kaynaklanmaktadır. Daha sonra her bir antijen-antikor çiftine karşılık, 100 antijen molekülünün ve 100 antikor molekülünün MITF+D5=>MITFD5 ağırlığına eşdeğer bir toplam basınç (9.612451×10^{-11} Pa) uygulanmıştır. Modellemede, antijenlerin, konsolun tüm antikorlarıyla etkileşime girdiği varsayılmaktadır. Bu nedenle yer değiştirme, ve rezonans frekansında görülen sapma 100 antijen ve 100 antikorun basınç eşdeğerinin neden olduğu sapma ile aynı olacaktır. Bu durumda hesaplanan frekans değeri 14.910 kHz bulunmuştur.

Tablo 3. Dikdörtgen mikrokonsolda rezonans frekansında gerçekleşen kayma değerleri

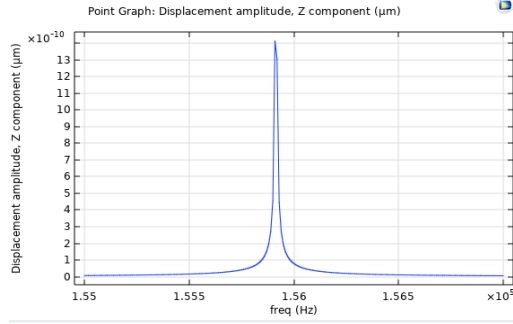
Si_3N_4 (0.5 μm)	Si_3N_4 +Altın (50 nm)	Si_3N_4 +Altın+D5	Si_3N_4 +Altın+D5+MITF
18.040 kHz	15.100 kHz	14.980 kHz	14.910 kHz

Aynı işlem V tipi konsol içinde yapılmış olup Şekil 4.3 de belirtilmiştir. V tipi mikrokonsolun Rezonans frekansında gerçekleşen kayma değerleri, konsolun üzeri altın (Şekil 4.3a) kaplandığında elde edilen grafik, altın üzerine antikorların (Şekil 4.3b) bağlanması ile elde

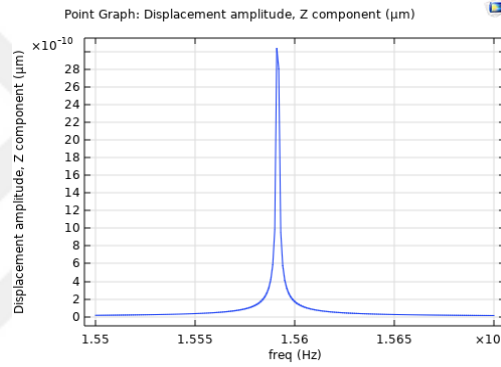
edilen ve antijen-antikorların (Şekil 4.3c) immobilizasyonu sonucu elde edilen grafik gösterilmiştir.



(a) Si₃N₄+Altın (50 nm)-156.090 kHz



(b) Si₃N₄+Altın+D5-155.920 kHz



(c) Si₃N₄+Altın+D5+MITF-155.910 kHz

Şekil 4. 3. V tipi mikro konsol üzerine uygulanan sırasıyla Altın eklenmesi (a) , Antikor (b) ve Antijen-Antikor (c) immübilizasyonu sonucu rezonans frekansta gerçekleşen kayma

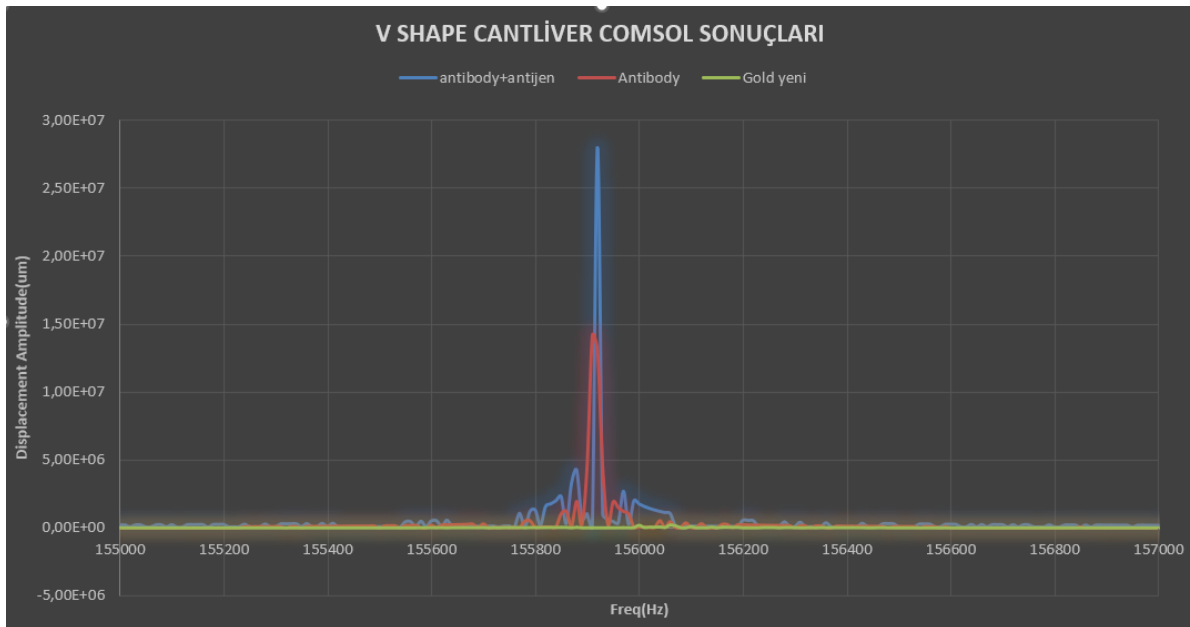
Tablo 4. V tipi mikrokonsolda rezonans frekansında gerçekleşen kayma değerlerini vermektedir. Kalınlığı 0.5 µm olan Si₃N₄ dikdörtgen mikro konsolun rezonans frekans değeri, 50 nm altın kaplandığında 156.090 kHz bulunup, Tablo 5’te belirtilen referans probun nominal rezonans frekansı (125-160 kHz) aralığında yer almaktadır. Altın üzerine MITF antijenine özgü olduğu bilinen D5 monoklonal antikorları (anti-MITF) ile kaplanması amacıyla, giriş olarak 100 molekül antikor ağırlığına eşdeğer bir basınç (4.50512x 10⁻¹¹ Pa) tanımlanmıştır. Bu durumda frekans değeri 155.920 kHz’e kaymıştır. Rezonans frekansında görülen bu kayma

miktarı 100 antikorun basınç eşdeğerinin neden olduğu sapmadan dolayı kaynaklanmaktadır. Daha sonra her bir antijen-antikor çiftine karşılık, 100 antijen molekülünün ve 100 antikor molekülünün MITF+D5=>MITFD5 ağırlığına eşdeğer bir toplam basınç (9.612451×10^{-11} Pa) uygulanmıştır. Modellemede, antijenlerin, konsolun tüm antikorlarıyla etkileşime girdiği varsayılmaktadır. Bu nedenle yer değiştirme, ve rezonans frekansında görülen sapma 100 antijen ve 100 antikorun basınç eşdeğerinin neden olduğu sapma ile aynı olacaktır. Bu durumda hesaplanan frekans değeri 155.910 kHz bulunmuştur.

Tablo 4. V tipi mikrokonsolda rezonans frekansında gerçekleşen kayma değerleri

Si ₃ N ₄ +Altın (50 nm)	Si ₃ N ₄ +Altın+D5	Si ₃ N ₄ +Altın+D5+MITF
156.090 kHz	155.920 kHz	155.910 kHz

V tipi konsol üzerinin Altın kaplanması ile elde edilen yer değiştirme genliği (Sarı grafik) Altın kaplı konsola antikor bağlanması sonucu elde edilen yer değiştirme genliği (kırmızı grafik) ve Antikor ve antijen immübilizasyonu sonucu elde edilen yer değiştirme genliği (mavi grafik) yer almaktadır. 156.090 kHz pik değeri-genliği grafiğin skalasında çok küçük kaldığı için gözükmemektedir.



Şekil 4. 4. V tip mikro konsol üzerine uygulanan sırasıyla Altın (Gold) (sarı) , Antikor (Antibody) (kırmızı) ve Antijen-Antikor (Antigen+Antibody) (mavi) immübilizasyonu sonucu rezonans frekansta gerçekleşen kayma ve yer değiştirme genlikleri.

İlgili antijen MITF ve D5 antikorunun immübilizasyonu sonucu MITF+D5=>MITFD5 (ads) meydana gelecek rezonans frekansı Denklem 2.5 ve 2.7 kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar tezin 4.1 bölümünde verilmiştir.

4.2. Teorik Hesaplama Sonuçları ve Karşılaştırma

Teorik analiz ve uygulamalı analiz sonuçlarına dayanarak; Antijenlerin, konsolun tüm antikorlarıyla etkileşime girdiği varsayılmaktadır. Bu nedenle yer değiştirme, 100 antijen ve 100 antikorun basınç eşdeğerinin neden olduğu sapma ile aynı olacaktır. Uygulanan bu basınca istinaden V tipi Mikro konsolda 155.910 kHz'lik (Şekil 4.2) , dikdörtgen mikro konsolda ise 14.910 kHz'lik (Şekil 4.3) rezonans frekansı gözlemlenmiştir. Referans olarak aldığımız Bruker MLCT-F problarının çıplak (Silikon nitrür-50 nm Altın kaplı) rezonans frekansı 125 kHz-150 kHz aralığındadır. Simülasyon sonucumuz olan 156.090 kHz (Si_3N_4 +Altın (50 nm)), ve Denklem 2.7 kullanarak yaptığımız teorik hesaplamada olan 156.92 kHz ile karşılaştırıldığında modellemenin doğruluğu belirlenmiştir. Dikdörtgen mikro konsolda ise Bruker MLCT-B probu baz alınmıştır. Bu prob'da çıplak (Silikon nitrür-50 nm Altın kaplı) 10-20 kHz aralığında bir rezonans frekansına sahiptir. Yapılan ,simülasyon sonucunda 18.040 kHz (Si_3N_4 +Altın (50 nm)) bulunmuştur. Denklem 2.5 kullanılarak yapılan teorik hesaplamada ise 17.514 kHz rezonans frekansı bulunmuştur. Elde edilen sonuçlarda V tipi mikro konsol için % 0.528 hata payına rastlanırken dikdörtgen tip mikro konsol için ise %3.003 hata payına rastlanmıştır.

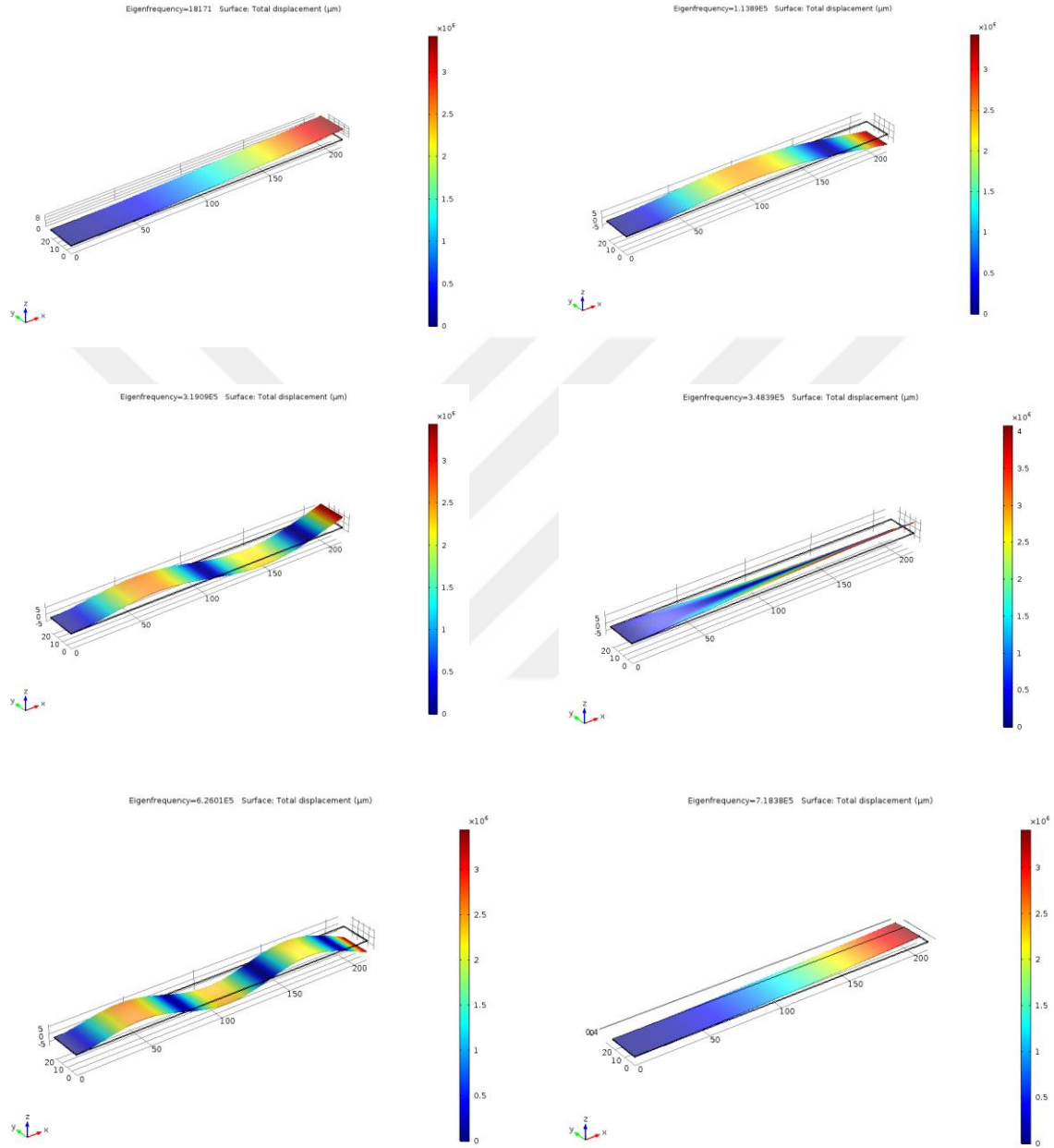
Tablo 5. Simülasyon ve Teorik sonuçların karşılaştırması

Konsol	Sim. F_{rez} (kHz) Si_3N_4 +Altın(50 nm)	Sim. F_{rez} (kHz) Si_3N_4 +Altın+D5+MITF	Teorik F_{rez}	Referans F_{rez}
V tipi	156.090 kHz	155.91 kHz	156.92 kHz	125-160 kHz
Dikdörtgen	18.040 kHz	14.910 kHz	17.514 kHz	10-20 kHz

4.3. Mikrokonsolların Frekans Modları

Mikrokonsolun frekans modlarının elde edilebilmesi, programın çalışma (Study) bölümünde özfrekans alanında (eigenfrequency) yapıldı. Dikdörtgen mikrokonsolun rezonans ve diğer ilk

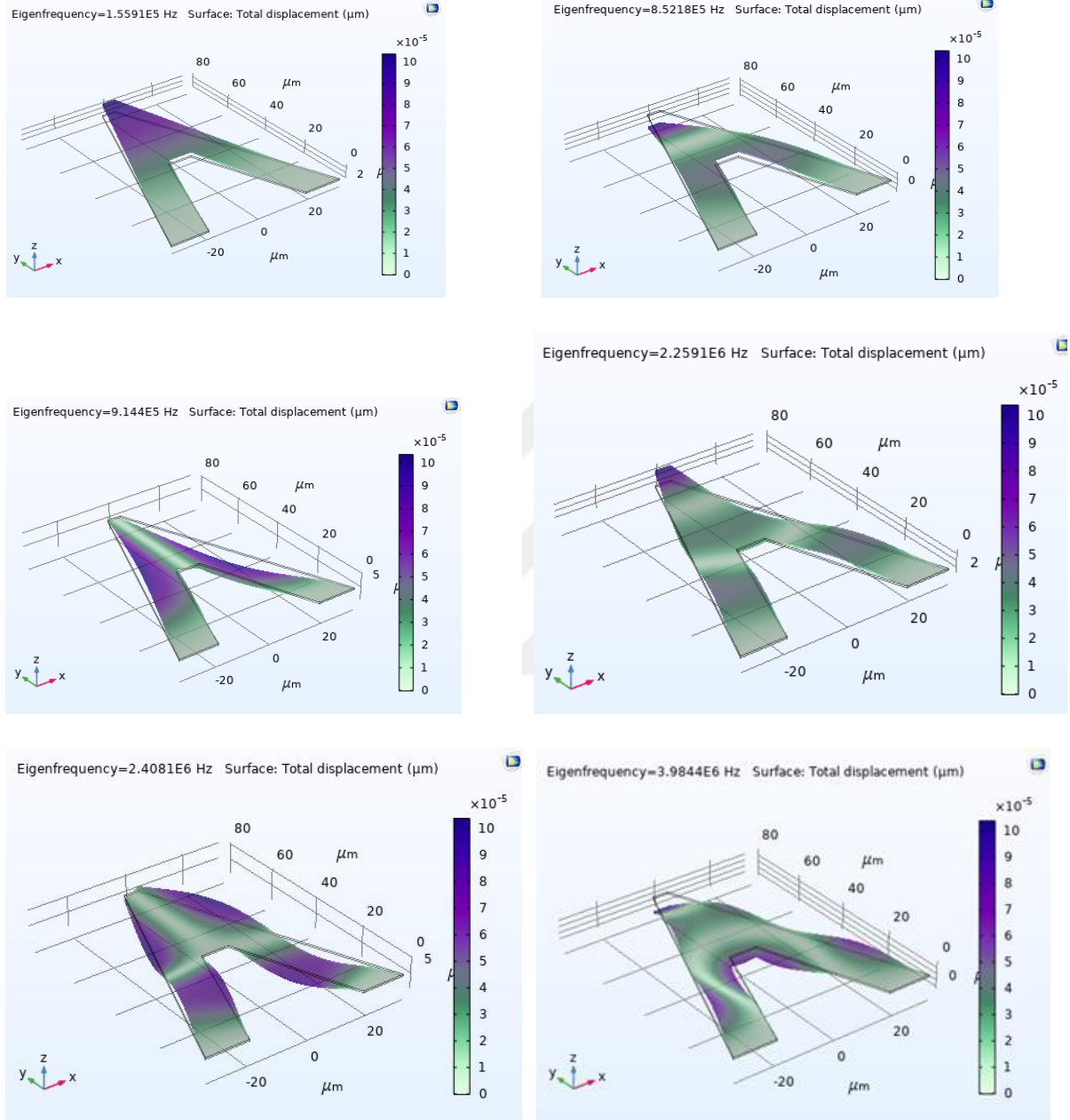
beş yüksek modları Şekil 4.5'te yer almaktadır. Dikdörtgen mikrokonsolun ilk altı özfrekans değerleri, belirtilen boyuna ve enine modlarda (Longitudinal-L, Transverse-T): 18.171 kHz (L), 113.85 kHz (L), 319.09 kHz (L), 348.39 kHz (T), 626.01 kHz (L) ve 710.38 kHz (T) bulunmuştur.



Şekil 4. 5. Dikdörtgen mikrokonsolun ilk altı özfrekans değerleri: 18.171 kHz (L), 113.85 kHz (L), 319.09 kHz (L), 348.39 kHz (T), 626.01 kHz (L) ve 710.38 kHz (T)

V tipi mikrokonsolun rezonans ve diğer ilk beş yüksek modları Şekil 4.5'te yer almaktadır. V tipi mikrokonsolun ilk altı özfrekans değerleri belirtilen boyuna ve enine modlarda

(Longitudinal-L, Transverse-T): 155.91 kHz (L), 852.18 kHz (L), 914.4 kHz (T), 2259.1 kHz (L), 2408.1 kHz (L-T) ve 3984.4 kHz (L-T) bulunmuştur.



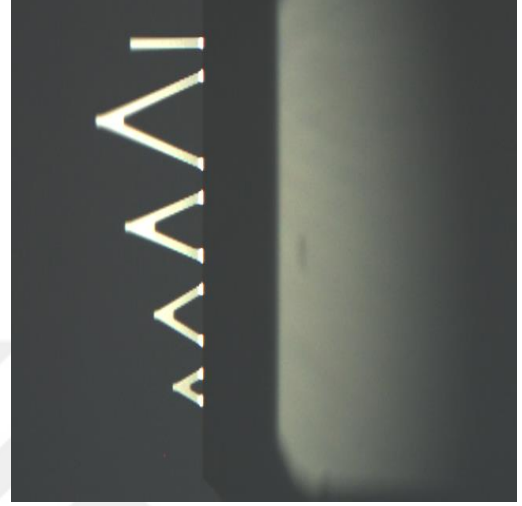
Şekil 4. 6. V tipi mikrokonsolun ilk altı özfrekans değerleri: 155.91 kHz (L), 852.18 kHz (L), 914.4 kHz (T), 2259.1 kHz (L), 2408.1 kHz (L-T) ve 3984.4 kHz (L-T)

4.4. Mikrokonsolların AKM Ölçümleri

Şekil 4.7a, Bruker firmasının Dimension Edge model atomik kuvvet mikroskopunu, Şekil 4.7b’de Bruker firmasının MLCT B(dikdörtgen) C-E-F (V-tipi) mikrokonsol yapılarının NanodriveSoftware kamersından alınmış görüntüsünü vermektedir.



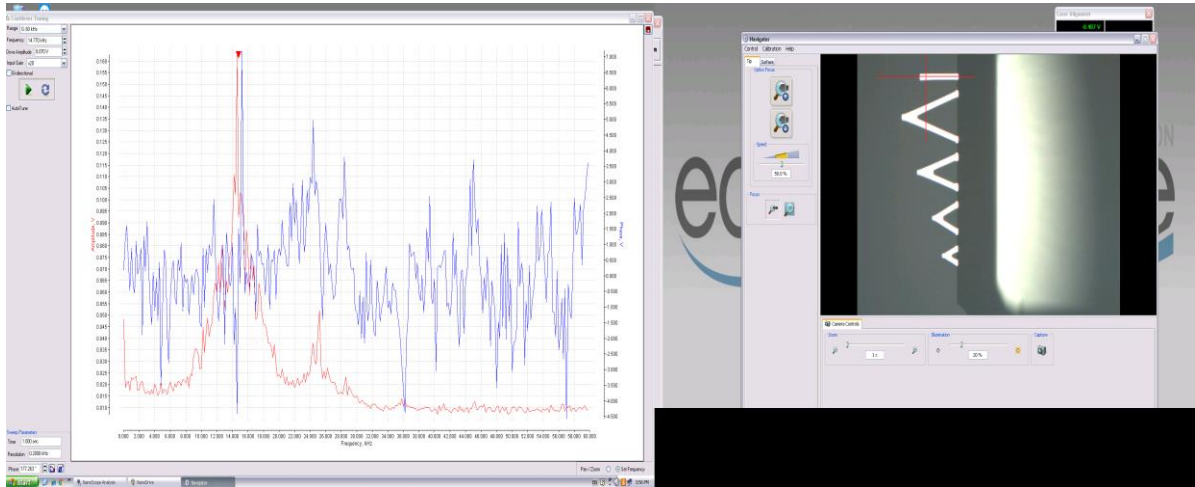
(a)



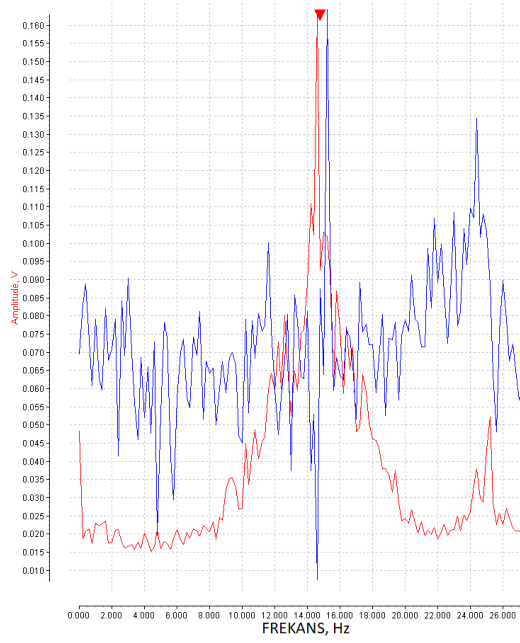
(b)

Şekil 4.7. (a) Bruker Dimension Edge, (b) Bruker MLCT (B)-dikdörtgen (C-D-E-F) V tipi mikrokonsolları (24)

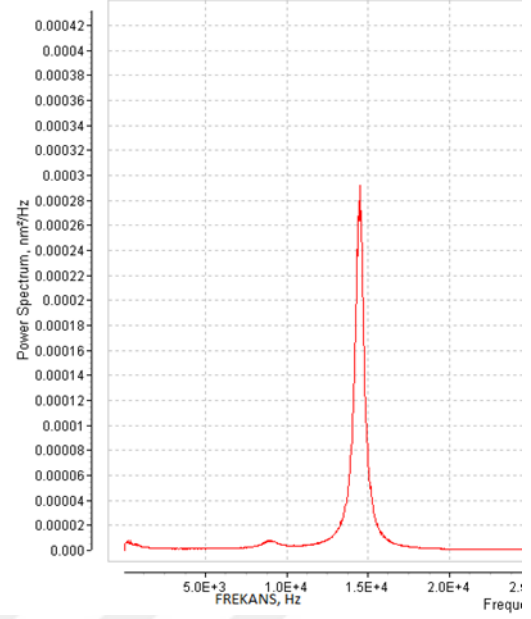
Dimension Edge kullanarak, MLCT-B mikrokonsolun termal ayar (thermal tune) modu (Şekil 4.8.c) ve dokunma modu ile (tapping mode) (Şekil 4.8a-b) rezonans frekans değerlerine ulaşıldı.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.8. Dimension Edge kullanarak, MLCT-B dikdörtgen tipi (Şekil 4.8b) mikrokonsolun termal ayar (thermal tune) modu ve dokunma modu ile (tapping mode) (Şekil 4.8a) rezonans frekans değeri-Pik değeri 14.770 Hz göstermektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mikrokonsol dönüştürücüler, yeni nesil kimyasal ve biyolojik sensörler için umut verici bir platform olarak kabul edilmektedir. Genel olarak, MEMS platformu, birçok kimyasal ve biyolojik türün hızlı analizine uygun, son derece hassas, düşük maliyetli sensörlerin geliştirilmesi ve seri üretimi için benzersiz bir yetenek sunar. Daha geleneksel sensörlerle karşılaştırıldığında, mikrokonsol sensörler gelişmiş dinamik yanıt, büyük ölçüde küçültülmüş boyut, yüksek hassasiyet ve artırılmış güvenilirliğe sahiptir. Rezonans modunda çalışan AKM mikrokonsol tabanlı sensörlerin zorlayıcı bir özelliği, aynı anda ölçülen dört yanıt parametresinin (rezonans frekansı kayması, faz değişikliği, genlik ve Q faktörü) olmasıdır.

MEMS biyosensörlerin geliştirilmesinde, iki temel ihtiyaç bulunmaktadır. Bunlardan biri ultra küçük boyut ve diğeri ultra yüksek hassasiyettir. Bu sayede, hastalık tanımlaması için çeşitli biyoanalitleri tespit ederek biyolojik tespit için taşınabilir bir platform haline gelmektir.

Bu çalışma kapsamında melanom biyobelirteci olan MITF ve D5 antikoru arasındaki spesifik etkileşim dinamiklerinden ve moleküller arası bağlanma yeteneğinden faydalanılarak bir Atomik Kuvvet Mikroskobu konsolunun fonksiyonel hale getirilerek MEMS tipi bir mikro konsol biyosensör tasarlaması yapılmıştır. Mikro konsolun yüzeyi, MITF antijenine özgü olduğu bilinen D5 monoklonal antikoları (anti-MITF) ile kaplanmıştır. MITF antijeni eklendiğinde, MITF antijeni ile D5 antikoru arasında birbirlerine olan affiniteleri nedeniyle biyokimyasal reaksiyonlar meydana gelir ve bir antijen-antikor kompleksi oluşur. Bu kompleks konsol üzerinde stres ve gerilim oluşturur. MITF-D5 arasındaki etkileşimler sonucu gerçekleşecek gerilim veya stres, konsolun rezonans frekansındaki sapma değerinden tespit edilmiştir. Konsol tipi mikro biyosensörlerin yüzeyinin fonksiyonlaştırılması Sonlu elemanlar analizi (FAE) kullanılarak yapılmıştır. Simülasyon sonuçları nümerik hesaplamalar ve AKM sonuçları ile desteklenmiştir.

Bu tez çalışmasında MITF temelli biyosensör ile kantitatif tayini hedef alınmış MITF melanoma biyomarkeri, melanoma etki eden bir antijendir. Literatürde başka protein aileleri için bir çok çalışma bulunsa da MITF proteinin kantitatif analizinin yapıldığı çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. MITF antijeni gerçek serumdaki değerini ölçmeye dayalı tasarladığımız biyosensör sistemi literatürde bir ilk olmaya adaydır. Her konsolun yüzeyinin, 100 molekül D5 antikoruyla işlevselleştirildiği varsayılmaktadır. Giriş olarak 100 molekül antikor ağırlığına eşdeğer bir basınç (4.50512×10^{-11} Pa) tanımlanmıştır. Daha sonra her bir antijen-antikor çiftine karşılık, 100 antijen molekülünün ve 100 antikor molekülünün MITF+D5=>MITFD5 ağırlığına

eşdeğer bir toplam basınç (9.612451×10^{-11} Pa) uygulanmıştır. Bu çalışmada, MITF antijenin Molekül ağırlığı=59 kDa ve D5 antijeninin molekül ağırlığı=52 kDa olarak alınmıştır (46). Modellemede, antijenlerin, konsolun tüm antikorlarıyla etkileşime girdiği varsayılmaktadır. Bu nedenle yer değiştirme, ve rezonans frekansında görülen sapma 100 antijen ve 100 antikorun basınç eşdeğerinin neden olduğu sapma ile aynı olacaktır. Eşdeğer toplam basıncın hesaplaması aşağıdaki gibi yapılmıştır. Sabit genişlikte ve kalınlıkta mikro konsolun sapmasının V tipi mikrokonsol için 8 µm uzunluğunda, Dikdörtgen tip mikro konsolun sapmasının 4 µm olduğu gözlenmiştir. Mikro konsolun stabilitesi ve hassasiyeti sadece uzunluk veya genişliğe veya diğer herhangi bir tek parametreye bağlı değildir. Aynı zamanda konsolun stabilitesi ve elde edilen sonuçların doğruluğu konsolun malzemesine , kaplanması gereken polisilikon, altın vb. gibi katmanların sayısına da bağlıdır.

Tasarımı yapılan mikrokonsolun elde edilen simülasyon ve teorik sonuçları değerlendirilmiş olup referans olarak alınan MLCT-B ve F tipi AFM problemlerinin değerleriyle karşılaştırılmıştır. İlgili firmanın verdiği bilgilere göre, 150-200 kHz ve 10-20 kHz aralığında frekans veren V tipi mikrokonsol ve Dikdörtgen tip mikrokonsol için simülasyon sonuçları, AKM ölçümleri ve teorik sonuçları olması gereken prob frekans aralığında olduğu tespit edilmiştir. Ve bu sonuçlar, üzerinde çalışma yaptığımız modellemenin doğruluğunu göstermektedir. Örneğin V tipi mikro konsolun yüzeyi fonksiyonel hale getirilmesi amacıyla, MITF antijenine özgü olduğu bilinen D5 monoklonal antikorları (anti-MITF) ile kaplandığında frekans değeri 155.920 kHz'e kaymıştır. Rezonans frekansında görülen bu kayma miktarı 100 antikorun basınç eşdeğerinin neden olduğu sapmadan dolayı kaynaklanmaktadır. Daha sonra her bir antijen-antikor çiftine karşılık, 100 antijen molekülünü eklendiğinde frekans değeri 155.910 kHz bulunmuştur.

Bu amaçla yüzeyleri fonksiyonelleştirilerek tasarlanan konsollara dayalı sonderece hassas bu yeni algılama tekniğinin tıp dünyasında ve gündelik hayatta kullanımı, örneğin melanoma vb. kanserde erken teşhis de farklı bir olanak sağlayabileceği düşünülmektedir. Konsol tabanlı biyosensörler, özellikle biyokimyasal analizler alanında muazzam bir potansiyele sahiptir. Hızlı sonuç veren , yüksek hassasiyetli ve güvenilir olan bu sensörler; yaşam bilimlerinde, biyolojik moleküller arasındaki etkileşimin temellerini incelenmesi, kimyasal veya biyolojik analizlerde, ilaç çalışmalarında, çevresel analizlerde uygulamala alanlarında bulunmaktadır.

6. Kaynakça

1. Dölen M., Kaplan H..Mikro Elektro Mekanik Sistemler(Mems). 2002, Makina Tasarım Ve İmalat Dergisi, S. 1-2.
2. Ahmed, A.. Design, Simulation And Analysis Of Piezoresistive Microcantilever For Biosensing Applications. December 2016.
3. Nordström,M., Keller S.,Lillemose M.,Johansson A., Dohn S., Haeffliger D.,Blagoi G., Havsteen-Jakobsen M.,Boisen A..Su-8 Cantilevers For Bio/Chemical Sensing; Fabrication,Characterisation And Development Of Novel Read-Out Methods .. 2008, Sensors 2008, 8, 1595-1612, S. 2.
4. Hsu, Tr. Mems & Microsystems Design And Manufacture” Mcgraw Hill Education(India) Private Limited. 2017.
5. 5.Elektrikde.Com.<https://Www.Elektrikde.Com/Gelecegin-Teknolojisi-Nano-Elektro-Mekanik-Sistemler-Nems/>.
6. Jain, S., & Pise, N.Computer Aided Melanoma Skin Cancer Detection Using Image Processing. 2015, Procedia Computer Science, S. 735-740.
7. Chaturvedi · P. Mudgal, A.Abcd Features Extraction-Based Melanoma Detection And Classification. 2020. International Conference On Artificial Intelligence.
8. Howard L.Kaufman, Janice M.Mehnert. Melanoma. London .2016.
9. Mahalikand, Np. Micromanufacturing And Nanotechnology: Nanomechanical Cantilever For Biological Sensors. 299, Berlin : Springer, 2006.
10. Zinoviev K., Moreno M., Laura M. Lechuga Mar Alvarez. Cantliver Biosensor. Optical Biosensors. Elsevier, 2008.
11. López-Lorente A., Valcárcel M. Analytical Nanoscience And Nanotechnology. Comprehensive Analytical Chemistry. Elsevier, 2014.
12. Fizik Soc. R., Shuttleworth. 63, Londra B. , 1950, Cilt 374.
13. Michael F. Hagan, Arun Majumdar And Arup K. Chakraborty. Nanomechanical Forces Generated By Surface Grafted Dna. California : American Chemical Society, 2002.
14. Stoney, Mr. G. G. Proc. R. Soc. Londra , 1909.
15. Pin Lu, H. P. Lee, C. Lu, And S. J. O’shea. Surface Stress Effects On The Resonance Properties Of Cantilever Sensors. Singapore . The American Physical Society, 2005.
16. Craighead, B. Ilica And H. G..Attogram Detection Using Nanoelectromechanical Oscillators. New York : American Institute Of Physics, 2004.
17. Lavrik, N.V., Sepaniak, M.J., Datskos, P.G. Lavrik, N.V., Sepaniak, M.J., Datskos, P.G. 7, 2004, Scopus Preview, Cilt 75, S. 2229-2253.
18. Özer, S. Exchange Bias Systems Studied By High Resolution Quatitative Magnetic Force Microscopy. Doktora Tezi. 2012.

19. Nordström, M., Keller, S., Lillemose, M., Johansson, A., Dohn, S., Haefliger, D., Su-8 Cantilevers For Bio/Chemical Sensing; Fabrication, Characterisation And Development Of Novel Read-Out Methods. 2008, Msp1.
20. Dufrene, D. Müller And Y. Atomic Force Microscopy As A Multifunctional Molecular Toolbox In Nanobiotechnology. 2008, Nature Nanotechnology, Cilt 5, S. 261-269.
21. Dufrene, D. Müller And Y. Atomic Force Microscopy: A Nanoscopic Window On The Cell Surface. 8, 2011, Trends In Cell Biology, Vol. 21, No. 8, Pp. 461–469, 2011., Cilt 21, S. 461-469.
22. T. G. Kuznetsova, M. N. Starodubtseva, N. I. Yegorenkov, S. A. Chizhik, And R. I. Zhdanov. Atomic Force Microscopy Probing Of Cell Elasticity.. 8, 2007, Micron, Cilt 38, S. 824-833.
23. K. Tomankova, P. Kolar, J. Malohlava, And H. Kolarova. Mechanical Characterization Of Hela Cells Using Atomic Force Microscopy. 2012, Current Microscopy Contributions To Advances In Science And Technology, S. 549-554.
24. Bruker Afm Probs (Mlct). Bruker. <https://www.brukerafmprobes.com/P-3444-Mlct>.
25. Silviaferretti, S., David A. Russel, Lkim E. Sapsford, David J. Richardson. Self-Assembled Monolayers: A Versatile Tool For The Formulation Of Bio-Surfaces. 9, 2000, Trac Trends In Analytical Chemistry, Cilt 19, S. 530-540.
26. Guanghua Wu, Ram H. Datar, Karolyn M. Hansen, Thomas Thundat, Richard J. Cote. Bioassay Of Prostate-Specific Antigen (Psa) Using Microcantilevers. Los Angeles : Nature Biotechnology, 2001. 19.
27. Purwidyantri, A.. Slideserve. Mems-For-Biomedical-Applications. July 2014. <https://www.slideserve.com/Vanna/Mems-For-Biomedical-Applications>.
28. Hosseinia, R. Hamedib, M.. Resonant Frequency Of Bimorph Triangular V-Shaped Piezoelectric Cantilever Energy Harvester. 65-73, 2016, Journal Of Micromechanics And Microengineering, Cilt 1, S. 6.
29. F. Loizeau, F. Loizeau, T. Akiyama, S. Gautsch, A. Meister, R. Smajda, P. Vettiger, G. Weder, N. F. De Rooij. 2d Cantilever Array With Spherical Tips For Parallel Force Spectroscopy On Cancerous Cells. Switzerland : Ecole Polytechnique Fédérale De Lausanne (Epfl). 2013 Transducers & Eurosensors XXVII: The 17th International Conference On Solid-State Sensors, Actuators And Microsystems (Transducers & Eurosensors XXVII).
30. Saranya R, Saranya K, Ceemati D, Chandra Devi K, Meenakshi Sundaram N. Design Of Mems Based Microcantilever For Tuberculosis Detection. Bangalore , 2013. Proceedings Of The 2013 Comsol Conference.
31. Kurmendra, J., Kumarb R. Micro-Cantilevered Mems Biosensor For Detection Of Malaria Protozoan Parasites. 99-107, 2019, Journal Of Computational Applied Mechanics, Cilt 1, S. 50.

32. Selvaraj,S., Manoa,S.,Sugumaran,P.,Pria Jayarama J.. Multiphysics Modeling And Simulation Of Nanoscale Cantilever Array Sensor For The Detection Of Hiv Antigens. 15-18, 2014, Journal Of Nanoscience And Nanotechnology, Cilt 1, S. 2.
33. Katti,S.,Naragund,P.,Saradesai,V., Vidhyashree,P.,Kaushik,M. ,Anilkumar V Nandi, Mungurwadi,V.. 2012.Mems Based Sensor For Blood Group Investigation.
34. K. Beulah Sujan, T. Shanmuganantham. Bio-Mems Cantilever Sensor Design And Analysis For Detecting Multiple Diseases2017, Ieee International Conference On Circuits And Systems.
35. Siqi Fu, Haijing Wu,, Huiming Zhang, Christine G. Lian, Qianjin Lu. Dna Methylation/Hydroxymethylation İn Melanoma. 78163-78173, 2017, Oncotarget, Cilt 44, S. 8.
36. Jaina,S.,Jagtap,V.,Pise,N.. Computer Aided Melanoma Skin Cancer Detection Using Image Processing. 736-741, 2015, Procedia Computer Science,, S. 48.
37. Andor,N., Graham, T., Jansen,M., Aktipis,A., Petritsch,C.,Hanlee P Ji, Maley,C.. Pan-Cancer Analysis Of The Extent And Consequences Of İntratumor Heterogeneity. 105-113, 2016, Nature Medicine,, Cilt 1, S. 22.
38. Eigentler, Claus Garbe And Thomas K..Diagnosis And Treatment Of Cutaneous Melanoma2007, Melanoma Research, Cilt 2, S. 17.
39. Patel,J., Patel,P..Biosensors And Biomarkers: Promising Tools For Cancer Diagnosis. 2017, International Journal Of Biosensors & Bioelectronics, Cilt 3, S. 3.
40. Rusling, J. F., Bishop, G. W., Doan, N. M., & Ve Papadimitrakopoulos, F. Nanomaterials And Biomaterials İn Electrochemical Arrays For Protein Detection. 12-30, 2014, Journal Of Materials Chemistry, Cilt 1, S. 2.
41. Role Of. Eman M. Hassan, Maria C. Derosa. Recent Advances İn Cancer Early Detection And Diagnosis: 2020, Trac Trends İn Analytical Chemistry, Cilt 115806, S. 124.
42. Weinstein,D., Leininger,J., Hamby,C., Safai B.. Diagnostic And Prognostic Biomarkers İn Melanoma. 13-24, 2014, The Journal Of Clinical And Aesthetic Dermatology, Cilt 6, S. 7.
43. Bosserhoff, Anja K..Novel Biomarkers İn Malignant Melanoma. 28-35, 2006, Clinica Chimica Acta, Cilt 1-2, S. 367.
44. Guo,R.,Franco-Palacios, M.,Russell,M.,Goddard,L., Hassell,L.,Gillies,E.,Fung,K.. Microphthalmia Transcription Factor (Mitf) As A Diagnostic Marker For Metastatic Melanomas Negative For Other Melanoma Markers. 1658, 2013, International Journal Of Clinical And Experimental Pathology, Cilt 8, S. 6.
45. Roy King, M.D., Paul B. Googe, M.D., Katherine N. Weilbaecher, M.D..Microphthalmia Transcription Factor Expression İn Cutaneous Benign, Malignant Melanocytic, And Nonmelanocytic Tumors.51-57, 2005, The American Journal Of Surgical Pathology, Cilt 1, S. 25.

46. Microphthalmia Transcription Factor (Mitf) (C5/D5) Mouse Monoclonal Antibody. Cell Marque. https://www.cellmarque.com/Antibodies/Cm/2024/Microphthalmia-Transcription-Factor-Mitf_C5-D5.
47. Sinobiology. Mitf Protein Overview: Sequence, Structure, Function And Protein Interaction. Sinobiological. <https://www.sinobiological.com/Resource/Mitf/Proteins>.
48. Bruker AFM Probes. Bruker. <https://www.bruker-afm-probes.com/P-3444-Mlct.aspx>.
49. Nickolay V. Lavrik, Michael J. Sepaniak, Panos G. Datskos. Tennessee. Cantilever Transducers As A Platform For Chemical And Biological Sensors. American Institute Of Physics, 2004.
50. Ilara, Ralph G. Nuzzo And David L.. Adsorption Of Bifunctional Organic Disulfides On Gold Surfaces. American Chemical Society, 1983.
51. Nordström, M., Keller, S., Lillemose, M., Johansson, A., Dohn, S., Haefliger, D., Blagoi, G., Havsteen-Jakobsen, M., Boisen, V.. Su-8 Cantilevers For Bio/Chemical Sensing; Fabrication, Characterisation And Development Of Novel Read-Out Methods.