

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

LİSE SEVİYESİ FİKİR KATEGORİSİ

TAKIM ADI

miR-155

PROJE ADI

Altın Nanoçubuk Temelli Mikroakışkan Çip ile Trizomi-21'in

Teşhisi

BAŞVURU ID

426963

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. Proje Özeti	3
2. Problem/Sorun	3
3. Çözüm	4
4. Yöntem	5
5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü	11
6. Uygulanabilirlik	11
7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması	12
8. Proje Fikrinin Hedef Kitlesi (Kullanıcılar)	14
9. Riskler	14
10. Kaynaklar	14



1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Trizomi 21, günümüzde zihinsel hasara yol açan en yaygın genetik bozukluktur. 21. kromozomun genellikle yumurta hücresindeki mayoz bölünme hatası sonucu fazladan bir kopyasının bulunması ile oluşur. Dünyaya gelen her 700 bebekten biri Down sendromu (DS) teşhisiyle doğmaktadır ve bu oran her yıl artmaktadır (Strippoli ve ark., 2019). DS'nin prenatal teşhisi için mevcut yöntemler; kesin ve güvenilir teşhis koyabilme, anne ve bebek için sağlık riski oluşturmama, erişilebilir olma ve hızlı sonuç vermede yetersizdir (Brennan ve Cameron, 2001; Heywood ve ark., 2011; Er Baba ve Pınar, 2015; Shajpal ve Siddiqui, 2017). Projede; mevcut yöntemlerin hatalarının önüne geçilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda DS'nin teşhisi için ilk defa miRNA'ların LSPR temelli platformda kullanılmasıyla kesin, non-invaziv, erişilebilir ve hızlı sonuç veren yeni bir bakış geliştirilmiştir. Non-invazivlik için maternal kanda bulunabilen, spesifiklik için DS durumunda ekspresyonu fazlaca artan plasental miR-155; biyomarker olarak seçilmiştir (Ertürk ve ark., 2016; Brás ve ark., 2018). Biyosensörün çalışma mantığı, DS'li numunedeki aşırı miktarda hedef miR-155'in biyosensöre önceden konjuge edilen komplementer-miR-155'e bağlanarak biyosensörün yüzey yapısını sağlıklı numunelere göre fazlaca değiştirmesi ve LSPR cihazının bu aşırı değişimi algılamasına dayanmaktadır (Damborský ve ark., 2016). Komplementer miRNA-155; -OH ve -COOH uç gruplu moleküller ve EDC-NHS kimyası yardımıyla altın kaplı cama konjuge edilerek hedeflenen biyosensör üretilmiştir. 100, 10, 1 nM ve 100 pM hedef miR-155'in LSPR verilerinde neden olduğu sırasıyla 38,56; 26,86; 16,86; 11,81 nm değişikliğe dayanarak biyosensörün tüm miRNA konsantrasyonlarını algılayabildiği sonucuna varılmıştır (Fischer, 2010; Truong ve ark., 2012; Jeong ve ark. 2016). Projede; 60 dakikada sonuç vermesiyle hızlı, nükleik asit komplementerizasyonu ile özgül, 3µl hacimde 100 pM konsantrasyondaki miRNA çözeltisini saptayabilmesiyle hassas, hedeflenmeyen moleküllerle (miR-125b) etkileşmemesiyle kesin, doğru ve spesifik ölçüm yapan; anne ve bebek için sağlık riski oluşturmayan ve non-invaziv teşhis sağlayan erişilebilir bir biyosensör geliştirilmiş, mikroakışkan çipe uyarlanması planlanmıştır. Projedeki yaklaşım, DS'nin tanısındaki sorunların hepsine aynı anda çözüm getirme potansiyeli olan ilk ve tek yaklaşımdır. Ayrıca yaklaşım birçok hastalığın teşhisine ve point-of-care sistemine uyarlanabilir.

2. Problem/Sorun

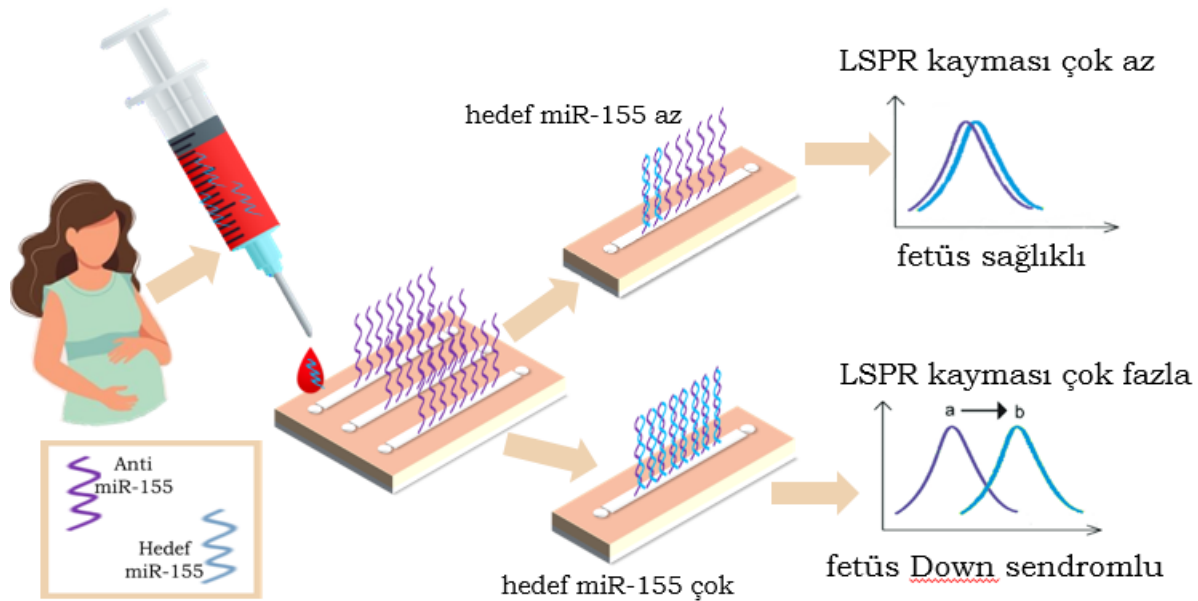
Down sendromlu (DS) gebelik durumunda aileye fetüsün geleceği hakkında seçim şansı veya bebek için maddi ve manevi hazırlık için zaman tanıyabilmek adına DS'nin erken ve kesin teşhisi çok büyük önem arz etmektedir. Tanı yöntemlerinde geçerli standartlar en az %90 duyarlılık ve en fazla %2 yanlış pozitifdir (Shajpal ve Siddiqui, 2017). Mevcut teşhis yöntemlerinden ikil, üçlü, dördü, kombine test ve ultrasonografi gibi anne ve bebeğe zarar vermeyen non-invaziv tanı yöntemlerinin yanlış pozitif oranı %2,5-5 iken duyarlılıkları ise %77-90'dır dolayısıyla standartların altındadır. Amniyosentez, koryonik villüs örnekleme, preimplantasyon, kordo-sentez ve fetal biyopsi gibi invaziv testler ise anne ve bebeğe zarar verme riski taşımaktadır, enfeksiyonlara hatta %3 oranla düşüğe dahi sebebiyet vermektedir. Serbest fetal DNA analizi ise erişilebilir değildir. Kısacası DS'nin prenatal teşhisi için mevcut yöntemlerin hiçbiri; kesin ve güvenilir teşhis koyabilme, anne ve bebek için sağlık riski oluşturmama, erişilebilir olma ve hızlı sonuç verme kriterlerinin hepsini aynı anda

karşılayamamaktadır. (Chard ve Macintosh, 1995; Brennand ve Cameron, 2001; Heywood ve ark., 2011; Erbaba ve Pınar, 2015; Shajpal ve Siddiqui, 2017). Nükleik asit komplementerizasyonu ile kesinlik ve hızlı teşhis sağlanırken yaklaşımın maternal kanla çalışmasıyla invazivlik sorunu çözülmüştür. Ayrıca düşük maliyetli malzemeler tercih edilerek erişilebilirlik sorunu çözülmüştür.

3. Çözüm

Plasental miR'ler gibi anne kanından kolayca elde edilebilecek bir biyomarker kullanımıyla invazivlik sorununun çözülmüştür. Literatürde birçok açıdan Down sendromuyla ilişkilendirilen miR-155'in biyomarker olarak kullanılmasıyla spesifiklik sağlanmıştır (Faraoni ve ark., 2009). Hızlılık, pratiklik, erişilebilirlik ve hassaslık elde etmek amacıyla Lokalize Yüze Plazmon Rezonans (LSPR) temelli bir mikroakışkan çip tasarlanmıştır. miR-155 ekspresyonu dolayısıyla da anne kanına geçen miR-155 miktarı DS durumunda artar. Tasarlanan biyosensörün çalışma mantığı; DS'ye bağlı olarak numune içerisinde aşırı miktarda hedef miR-155'in bulunması dolayısıyla yüzeye önceden konjuge edilen komplementer miR-155 ile çok miktarda bağ yaparak biyosensörün yüzey yapısını aşırı miktarda değiştirmesi ve LSPR cihazının yüzeydeki bu aşırı değişimi algılamasına dayanmaktadır. Kısacası ölçülen değişim miktarına göre miR-155 konsantrasyonu dolayısıyla da DS riski belirlenebilir (Lim ve ark., 2015; Damborský ve ark., 2016; Brás ve ark., 2018).

Anomalinin doğum sonrası fark edilmesi dolayısıyla ailenin gebelik üzerinde seçim şansının olmaması, gebeliğin gerekli doğru tıbbi takibinin ve doğum sonrası planlama ve hazırlığın yapılamaması büyük bir toplumsal problemdir. Projede tasarlanan mikroakışkan çip kesin, doğru ve erken teşhis sağlayarak bu problemi çözer ve aileye gebelik hakkında seçim şansı verirken gebeliğin DS'ye uygun doğru tıbbi takibine ve doğum sonrası planlama ve hazırlığa olanak verir.



Şekil 1. Projede geliştirilen çözümün akış şeması (Tasarlanan mikroakışkan çip ile Down sendromu teşhisinin konulması).

4. Yöntem

4.1. Malzemeler

Camların modifikasyonunda lamel (Isolab), sülfürik asit (H₂SO₄, Sigma Aldrich), hidrojen peroksit (H₂O₂, Sigma Aldrich), aminopropyltriethoxysilane (APTES, Sigma) kullanılmıştır. Aurik asit (HAuCl₄, Alfa Aesar), potasyum karbonat (K₂CO₃, Sigma Aldrich), polietilen glikol (PEG, Laysan Bio, Inc) sodyum borhidrür (NaBH₄, Sigma Aldrich), trimetil amonyum bromür (CTAB, Alfa Aesar), L-askorbik asit (Fluka) ve ultra saf su altın nanoçubuk sentezinde kullanılmıştır. Kırılma indeksi çalışmasında toluen (Sigma Aldrich) ve etanol (Sigma Aldrich) kullanılmıştır. Komplementer amin uçlu miRNA-155'in biyosensörün yüzeyine bağlanması amacıyla -OH uç gruplu molekül (Triethylene glycol mono-11-mercaptoundecyl ether, Sigma Aldrich), -COOH uç gruplu molekül (23-(9-Mercaptononyl)-3,6,9,12,15,18,21-heptaotricosanoic Acid, Sigma Aldrich), EDC molekülü ((3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, Sigma Aldrich), Sulfo-NHS molekülü, (N-hydroxysulfosuccinimide) (Thermo Scientific).

Kullanılan miRNA dizileri (HPLC saflığında, Biomers, Almanya) aşağıdaki gibidir:

- Hedef miR-155 (22 bp): 5'-UGC CUC CAA CUG ACU CCU ACA U-3'
- Amin modifiyeli komplementer miR-155 (22 bp): 5'- NH₂ AUG UAG GAG UCA GUU GGA GGC A -3'

Negatif kontrol amacıyla kullanılan miR-125b-5p primeri (HPLC saflığında, abm, Kanada) dizisi aşağıdaki gibidir:

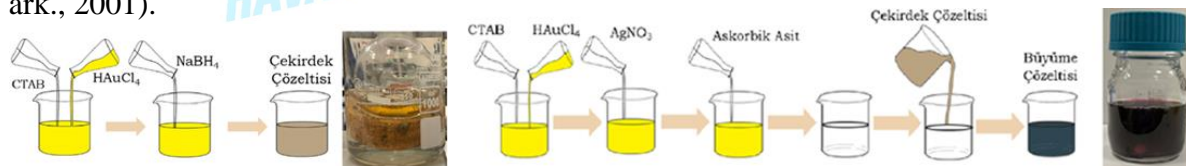
- miR-125b-5p (22 bp): 5'-UCC CUG AGA CCC UAA CUU GUG A-3'

4.2 Altın Nanoçubukların (GNR) Üretimi

4.2.1 Çekirdek ve Büyüme Çözeltisinin Hazırlanması

Çekirdek çözeltisi; çekirdek aracılıklı sentez yöntemiyle; 0,25 ml, 0,01 M HAuCl₄; 9,75 ml, 0,1 M CTAB ve 0,6 ml, 0,01 M NaBH₄ solüsyonları kullanılarak hazırlanmış; fazla sodyumun uzaklaştırılması için manyetik karıştırıcıda iki dakika işlem görmüştür (Jana ve ark., 2001) (Şekil 2).

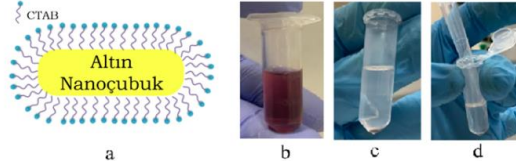
Büyüme çözeltisi hazırlanışında (altın nanoparçacıkların altın nanoçubuklara (GNR) dönüştürülmesi) 0,5 ml, 0,01 M HAuCl₄; 55 µl, 0,1 M askorbik asit; 75 µl, 0,1 M AgNO₃; 9,5 ml, 0,1 M CTAB ve 12 µl çekirdek çözeltisi kullanılmıştır. LSPR ölçümü yapılmıştır. (Jana ve ark., 2001).



Şekil 2. Çekirdek ve büyüme çözeltilerinin hazırlanışı ve son halleri.

4.2.2 Altın Nanoçubukların Yüzeyindeki CTAB Moleküllerinin Uzaklaştırılması

GNR'lerin formunu koruyan CTAB, toksik olduğundan uzaklaştırılmalıdır. 12.000 rpm 15 dk. santrifüjün ardından tüplerin üstünde kalan CTAB pipetle uzaklaştırılmıştır. Dibe çöken GNR'lere 1 ml saf su eklenerek işlem tekrarlanmıştır (Şekil 3). LSPR ölçümleri alınmıştır. (Liopo ve ark., 2012)



Şekil 3. CTAB'ın uzaklaştırılması. **a:** GNR'nin CTAB uzaklaştırılmadan önceki halinin şematik gösterimi (Cao ve ark., 2014) **b:** GNR'lerin santrifüjden önceki hali **c:** GNR'lerin santrifüjden sonraki hali **d:** Üstte kalan CTAB'ın uzaklaştırılması.

4.2.3 Altın Nanoçubukların Polietilen Glikol (PEG) ile Kaplanması

CTAB'ın görevini yapacak olan PEG (5000 g/mol) yardımıyla 1:20 oranında PEG-su çözeltisi hazırlanmış, çökelmeyi önlemek için potasyum karbonat eklenerek GNR solüsyonuyla karıştırılmıştır. Solüsyon 250 rpm hızla 24 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. 12.000 rpm 15 dk santrifüjün ardından üstte kalan kısımlar pipetle ayrıştırılmış ve tüplere birer ml su eklenerek birleştirilmiştir (Zhou ve ark., 2017). LSPR ölçümü alınmıştır.

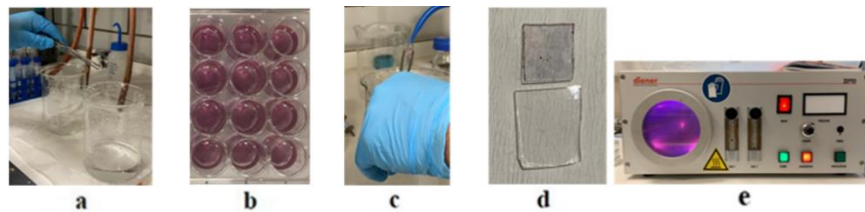
4.3 Altın Nanoparçacık Temelli Cam Biyosensör Tasarımı

4.3.1 Cam Yüzeyin Temizlenmesi

Mikroskop lamları (~7x8mm); yüzeydeki -OH gruplarının aktivasyonu ve kalıntıların temizlenmesi için Piranha solüsyonunda (3:1 oranında 15 ml sülfürik asit ve 5 ml hidrojen peroksit karışımı) 30 dk bekletilmiş, saf suyla yıkanıp azot gazıyla kurutulmuştur (Mayer ve ark., 2008).

4.3.2 Cam Yüzeyin Modifikasyonu

APTES solüsyonu hazırlamak için falkon başına 12 µl 5 mM aminopropyltriethoxysilane (APTES), 10 ml etanolde çözülmüştür. Camlar, 3 saat APTES solüsyonunda bekletilmiş, önce etanol sonra saf suyla yıkanmış, azot gazıyla kurutulmuştur. APTES, yüzeydeki -OH gruplarıyla bağ yapar. Yüzeylerin altınla kaplanması için camlar PEG'li GNR çözeltisine 1 gün bırakılmış, saf suyla yıkanıp azot gazıyla kurutulmuştur. Camlar GNR solüsyonunun rengini almıştır. Camlara 0,5 mbar basınçta 2 dk 100 W oksijen plazma işlemi uygulanmıştır. Camların karakterizasyonu LSPR ve taramalı elektron mikroskopuyla (SEM) yapılmıştır. Mayer ve ark. (2008) uyarlanmıştır (Şekil 4).



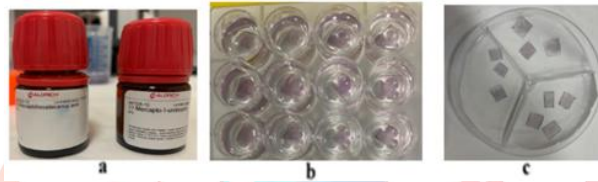
Şekil 4. Yüzeylerin GNR ile kaplanması **a:** camların, etanol-APTES çözeltisinde bekletilmesi **b:** camların PEG-GNR çözeltisindeki hali **c:** camların saf suyla yıkanması **d:** camların renk değişimi **e:** oksijen plazma işlemi.

4.3.3 Sensör Hassasiyetinin İncelenmesi (Refraktif İndeksi Çalışması)

Biyosensörün hassasiyet ölçümü; toluen (n=1,45), 1:3 oranında etanol/toluen (n=1,43), 1:1 oranında etanol/toluen (n=1,41), 3:1 oranında etanol/toluen (n=1,39), etanol (n=1,36) ve saf su (n=1,33) solüsyonlarıyla yapılmıştır (Marinakos ve ark., 2007).

4.3.4 Altın Nanoçubuk İmmobilize Edilmiş Camın -COOH ve -OH Grupları ile Modifikasyonu

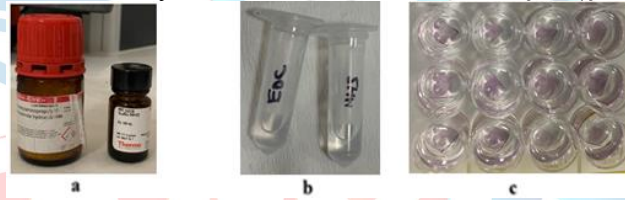
Hedef miRNA-155'in bağlanacağı anti-miRNA-155'in yüzeye konjugasyonu, -COOH ve -OH gruplarıyla sağlanmıştır. anti-miR-155, -COOH'a bağlanırken -OH yüzey dizilimini düzenler. 1:10 oranında 0,5 mM -COOH-etanol çözeltisi ve 4,5 mM -OH-etanol çözeltisi hazırlanmıştır ve birleştirilmiştir. Camlar çözeltilerde 18 saat bırakılmış, önce etanol sonra saf suyla yıkanmıştır. Karakterizasyon LSPR'la yapılmıştır (Truong ve ark., 2012) (Şekil 5).



Şekil 5. Camların -OH ve -COOH gruplarıyla etkileşimi. **a:** stok -COOH ve -OH **b:** camların etanol, -COOH ve -OH karışımındaki hali **c:** camların son hali.

4.3.5 EDC-NHS Kimyası ile Cam ve Komplementer miRNA Etkileşimi

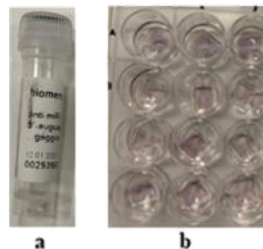
Komplementer miRNA'ların -COOH gruplarına bağlanması EDC-NHS kimyasıyla hızlandırılmıştır. çözeltileri hazırlanıp birleştirilmiş, Camlar; 0,4 M EDC-saf su ve 0,1M NHS-saf sudan oluşan EDC-NHS solüsyonunda 5 dakika bekletilmiştir (Şekil 6) (Fischer, 2010).



Şekil 6. Camların EDC-NHS çözeltilerine konulması **a:** toz halde Sulfo-NHS ve EDC **b:** EDC ve NHS'in saf suda çözülmüş hali **c:** Camların EDC-NHS çözeltisine konulmuş hali.

4.3.6 Komplementer miRNA Çözeltilerinin Hazırlanması ve Optimizasyon İşlemi

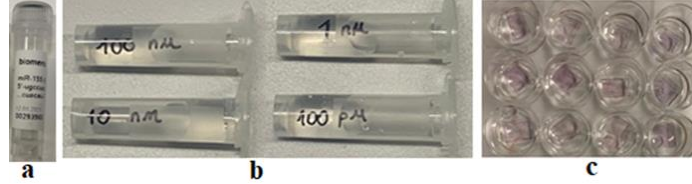
NH₂ uçlu toz komplementer miRNA-155; saf suda çözülerek 2 µM, 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM çözeltiler hazırlanmıştır. Camlar EDC-NHS işleminden sonra yıkanmadan komplementer miRNA çözeltisine 1 saat bırakılmıştır. Ardından yüzeyler saf suyla yıkanmış, LSPR ölçümleri yapılmıştır (Şekil 7). Camlar, 1 µM hedef miR-155 ile 60 dk. inkübe edilmiş ve LSPR ölçümleri alınmıştır. Jeong ve ark. (2016) modifiye edilmiştir.



Şekil 7. Komplementer miRNA çözeltisinin hazırlanışı **a:** toz komplementer miRNA-155 **b:** camların komplementer miRNA-155 çözeltisindeki hali.

4.3.7 Farklı Konsantrasyonlardaki Hedef miRNA Çözeltilerinin Hazırlanması

Hedef miRNA-155'in suda çözülmesiyle 1, 10, 100 nM ve 100 pM hedef miRNA çözeltileri hazırlanmıştır. Jeong ve ark. (2016) modifiye edilmiştir. Camlar, çözeltide 60 dk bekletilmiş, saf suyla yıkanıp LSPR ölçümleri yapılmıştır (Şekil 8).



Şekil 8. Hedef miRNA çözeltilerinin hazırlanması **a:** toz hedef miRNA-155 **b:** farklı konsantrasyonlardaki hedef miRNA-155 çözeltileri **c:** camların hedef miRNA-155 çözeltilerindeki hali.

4.3.8 Üretilen Biyosensörün Spesifikliğinin Saptanması

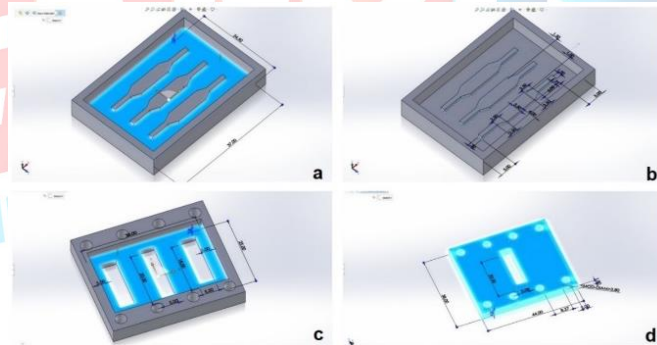
Biyosensörün spesifikliğini saptamak için camlar; 1 μ M miR-125b-5p (abm) çözeltisinde bölüm 2.3.7'deki şartlarda incelenmiştir.

4.4 Cam Biyosensörün Karakterizasyon İşlemleri

Biyosensörlerin hassasiyet ve verimlilikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve lokalize yüzey plazmon rezonansı (LSPR) ile ölçülmüştür. Biyosensörler, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezinde bulunan FEI QUANTA 250 FEG taramalı elektron mikroskobuna gönderilmiş; işlem uzmanlarca gerçekleştirilmiştir (Cao ve ark., 2014).

4.5 Mikroakışkan Temelli Çiplerin Tasarımı

Çip ve çipin üretimi için gerekli kalıpların 3 boyutlu çizimleri SolidWorks adlı programıyla yapılmış, 3 boyutlu yazıcı, PDMS ve yumuşak litografi yöntemi yardımıyla üretilmesi planlanmıştır. Mikroakışkan çip 37 mm x 24,50 mm boyutlarında tasarlanmıştır. Tasarım, fuziform şeklinde 3 adet 3 μ l hacimli mikrokanala sahiptir (Şekil 9). Mikroakışkan çipin üretiminde Chen ve ark. (2020) tarafından önerilen yöntem uyarlanacaktır.



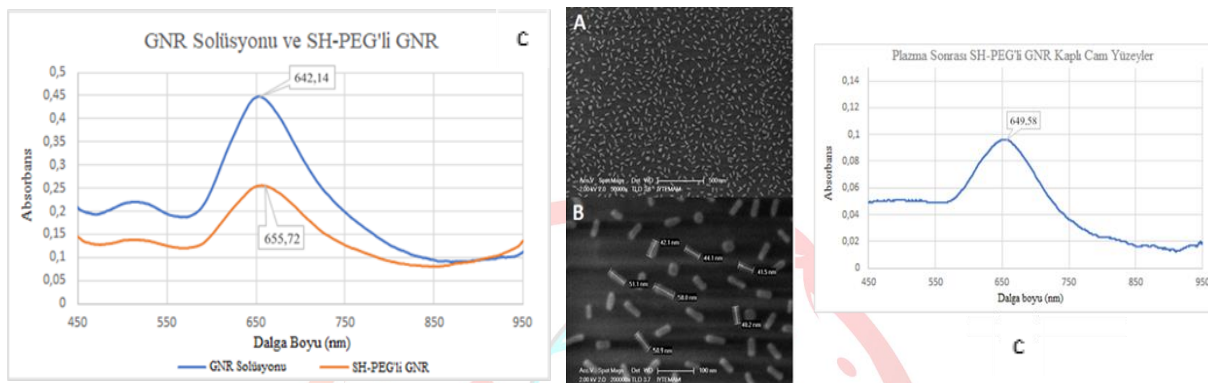
Şekil 9. mikroakışkan çipin teknik çizimleri **a:** çip kalıbına PDMS dökülmüş hali **b:** mikroakışkanın genel PDMS kalıbı **c:** mikroakışkanın PDMS üst kalıbı **d:** mikroakışkanın PDMS alt kalıbı.

4.6 Sonuçlar ve Tartışma

4.6.1 Altın Nanoçubukların Sentezi ve PEG ile Kaplanması ve Cam Yüzeyin SH-PEG'li GNR ile Kaplanması

Saydam GNR solüsyonunun önce açık sarıya sonra koyu sarıya dönmesi altının, nano boyutta altın taneciklerine dönüştüğünü kanıtlamaktadır. Solüsyonun mavi-mor renk alması

altın taneciklerinin uzayarak istenen altın nanoçubuklara dönüştüğünü göstermektedir. GNR solüsyonunun LSPR değeri 642,14 nm'dir. CTAB uzaklaştırılıp SH-PEG eklendikten sonra LSPR sonucu 13,58 nm kaymıştır. Şeffaf camlar altınla kaplanınca mavi-mor renk almıştır. Oksijen plazma işleminden sonra LSPR değeri 6,14 nm azalmış, 649,58 nm olarak ölçülmüştür. GNR'lerin cama homojen ve tutarlı şekilde immobilize olduğu ve ~50 nm olduğu SEM görüntülemesinde saptanmıştır (Şekil 10).

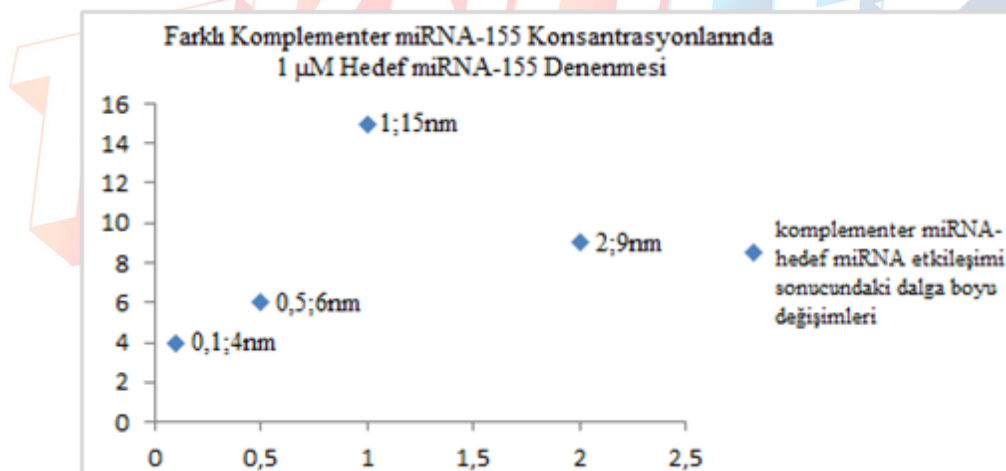


Şekil 10. GNR solüsyonu ve SH-PEG ile kaplanan GNR solüsyonunun LSPR spektrumu. Cama immobilize edilmiş PEG'lenmiş GNR'lerin görüntü ve spektrumu **a ve b**: SEM görüntüleri **c**: LSPR spektrumu

4.6.2 Sensör Hassasiyet

Tespiti ve Komplementer miRNA Optimizasyonu

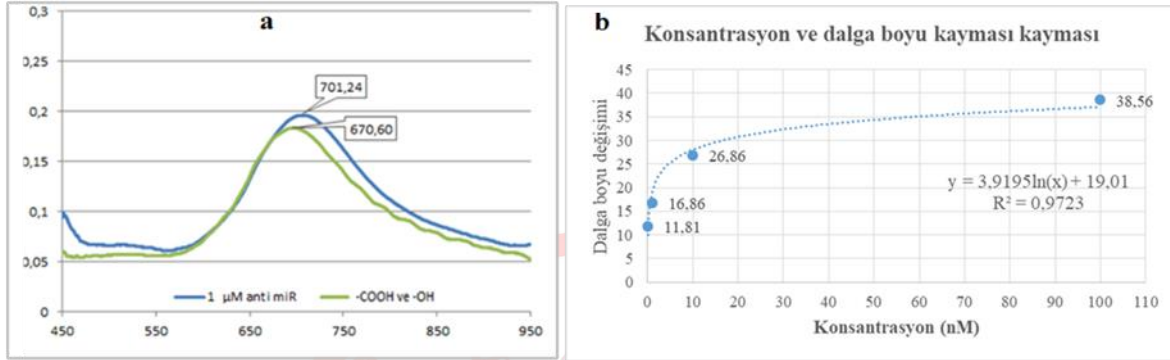
Refraktif indeks ölçümüyle hassasiyet, 215 RIU/nm olarak belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki komplementer-miR-155 çözeltileri, 1 μ M hedef miRNA-155'te denenmiştir. LSPR değerleri 0,1 μ M için 4nm, 0,5 μ M için 6nm, 1 μ M için 15 nm, 2 μ M için 9 nm kaymıştır. Optimum sonuç 1 μ M konsantrasyondadır (Şekil 11).



Şekil 11. Komplementer ve hedef miRNA etkileşimi sonucundaki dalga boyu değişimi.

4.6.3 Komplementer miR-155'in Biyosensöre Konjugasyonu ve Biyosensör ile Hedef miRNA-155'in Saptanması

Yüzeyin -OH ve -COOH gruplarıyla modifikasyonu sonrası LSPR dalga boyu 21,02 nm kaymıştır. Komplementer-miRNA-155'in bağlanmasıyla 30,64 nm kayma gözlenmiştir. Hedef miR-155'in 60 dakika inkübasyonu sonrasında yüzeydeki komplementer-miRNA-155'lerin hedef miRNA-155'lerle spesifik olarak etkileştiği LSPR ile saptanmıştır. 100, 10, 1 nM ve 1100 pM konsantrasyonlarda LSPR dalga boyunda sırasıyla 38,56 ve 26,86 ve 16,86 ve 11,81 nm kayma gözlenmiştir (Şekil 12).



Şekil 12. a: -OH, -COOH ve komplementer miR-155'in konjugasyonunu gösteren LSPR spektrumları. b: 100, 10, 1 nM ve 100 pM konsantrasyonlardaki hedef miR-155'in LSPR spektrumunun değişimi.

4.6.4 Üretilen Biyosensörün Spesifikliğini Saptanması

Biyosensörün spesifikliğini saptamak için abm firmasından 1 µM konsantrasyondaki miR-125b-5p biyosensörde denenerak LSPR'da incelenmiş ve dalga boyu değişimi olmamıştır.

Grafikler Excel programı yardımıyla çizilmiştir.

4.7 Sonuçların

Yorumlanması

Her 700 bebekten biri DS ile doğmaktadır ve bu oran her yıl artmaktadır (Strippoli ve ark., 2019). Mevcut teşhis yöntemleri; non-invaziv olma, kesinlik, doğruluk, erişilebilirlik, hızlılık kriterlerinin tümünü aynı anda karşılayamamaktadır. Dolayısıyla bu kriterleri karşılayabilecek yeni bir yaklaşım gereklidir. GNR temelli biyosensörler; kolayca modifiye edilebilmeleri ve fonksiyonelleştirilebilmeleri, biyomoleküller ile uyumlu olmaları nedenleriyle proje için en işlevsel seçenektir. Maternal kandaki biyobelirteçlerin kullanımı, hedeflenen tüm kriterleri karşılayabilecek non-invaziv bir yaklaşımın geliştirilebilmesi için uygundur (Brennand ve Cameron, 2001; Heywood ve ark., 2011; Nie ve ark., 2014; Erbaba ve Pınar, 2015; Shajpal ve Siddiqui, 2017). Plasental miRNA-155; maternal kana geçebilir, DS ile yakından ilişkilidir ve DS'li gebeliklerde ekspresyonu en fazla artan miRNA'lardan biridir dolayısıyla proje hedeflerine oldukça uygun bir biyomarkerdir. Maternal kanda 6,40 ng/µl olan miRNA konsantrasyonu DS durumunda 10-2000 kat artmaktadır (Kehler ve ark., 2015; Lim ve ark., 2015; Erturk ve ark., 2016; Brás ve ark., 2018). Projedeki yaklaşım; biyomarker olarak seçilen hedef miR-155'le komplementer miR-155'in komplementerizasyonuna dayandığından cam biyosensöre komplementer miRNA-155 konjuge edilmiş, hedef miRNA-155'le spesifik etkileşimine izin verilmiştir. Bu işlemin projenin ilerleyen aşamalarında mikroakışkan çipe uyarlanması planlanmaktadır. Biyosensörün çalışma mantığı, DS'li hamileliklerde miR-155 ekspresyonunun ve maternal kandaki miktarının sağlıklı hamileliklere göre artmasına dayanmaktadır. Bu aşırı değişim, biyosensör sayesinde LSPR verileriyle tespit edilir. Değişimin

miktarına göre kandaki miRNA miktarı tespit edilebilir. Böylece hamileliğin DS'li olma riski hesaplanabilir. Denenen 100, 10, 1 nM ve 100 pM hedef miR-155 çözeltilerinin LSPR verilerinde sırasıyla 38,56; 26,86; 16,86; 11,81 nm artış konsantrasyonlarla doğru orantılı olarak gözlenmiştir. Sonuç olarak DS teşhisi için anne kanında DS'ye bağlı olarak miktarı en fazla artan miRNA'lardan biri olan miRNA-155 ile *in vitro* şartlarda 60 dakika gibi kısa bir sürede sonuç vermesiyle **hızlı**, 100 pM (0,0006858 ng/μl) kadar düşük konsantrasyondaki miRNA çözeltilisine tepki vermesiyle **hassas**, hedef miRNA-155 ve komplementer miRNA-155 etkileşimi ve hedeflenmeyen moleküllerle (miR-125b) bağ yapmamasıyla **spesifik ve yanlış pozitif riski düşük**, materyallerin ucuz olmaları nedeniyle **ekonomik**, zor prosedürlere gerek kalmadan uygulanmasıyla **kolay uygulanabilir**, ölçüm cihazının portatif olmasıyla **erişilebilir**, **non-invaziv** olması sebebiyle anne ve bebek için hiçbir **sağlık riski oluşturmayan** bir biyosensör geliştirilmiş, mikroakışkan çipe uyarlanması planlanmıştır. *in vitro* şartlarda yapılan deneyler maternal kanla denenebilir. Geliştirilen yaklaşım ve biyosensör SMA, kanser vb. birçok başka hastalığa uyarlanabilir.

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Down sendromunun teşhisi amacıyla miR'lerin kullanımı dünyada bir ilktir ve literatürde benzer hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca miR'lerin bir platform üzerinde kullanımını baz alan yaklaşım, sadece Down sendromu için değil diğer birçok başka hastalığın teşhisi için de bir ilktir. Ek olarak projedeki yaklaşım, Down sendromunun tanısı alanındaki sorun ve eksikliklerin (Shajpal ve Siddiqui, 2017) hepsine aynı anda çözüm getirme potansiyeli olan ilk ve tek yaklaşımdır.

6. Uygulanabilirlik

Projedeki yaklaşımın çalışma mantığı, DS'li hamileliklerde miR-155 ekspresyonunun ve maternal kandaki miktarının sağlıklı hamileliklere göre artmasına dayanmaktadır. Bu aşırı değişim, biyosensör sayesinde LSPR verileriyle tespit edilir. Değişimin miktarına göre kandaki miRNA miktarı tespit edilebilir. Böylece hamileliğin DS'li olma riski hesaplanabilir. Projedeki bu yaklaşım tasarlanan mikroakışkan çip ile hayata geçirilecektir. Bu çip, anlatılan süreçteki değişimlerin algılanmasını sağlayan platformdur. Bu mikroakışkan çip temelde kanal sistemi ve cam biyosensörden oluşmaktadır (Şekil 9). Mikroakışkanın ön hazırlık deneyleri amacıyla öncelikle kanal sistemi üretilmeden sadece cam biyosensör üretilmiştir. Biyosensör üzerinde yapılan deneylerle anlatılan teşhis süreci simüle edilmiş ve beklenen optimum sonuçlar alınmıştır. Böylece bu ön deneylerle üretilecek olan mikroakışkan çipin çalışacağı kanıtlanmıştır. THS 1 seviyesinden başlayan proje mikroakışkan çip çizimlerinin tamamlanmış ve THS 2'deki hipotezlerin deneysel olarak cam biyosensörde kanıtlanması sebebiyle şu anda THS 3 seviyesindedir. Mikroakışkan çip çizimlerinin prototipe dönüştürülerek projenin THS 4 seviyesinde ulaştırılması planlanmaktadır. Daha sonra yapay serum/kan gibi gerçek ortamı temsil eden uygun çevresel ortamda deneylerin yapılarak THS 5 ve 6'ya ulaşılması hedeflenmiştir. THS 7, 8 ve 9'a ulaşılabilmesi için gerçek kanla deney yapılması gerektiğinden projenin bu basamaklara kadar geliştirilmesi ancak etik izinlerin alınmasıyla mümkün olacaktır (Bilim, Teknoloji ve Yenilik Politikaları Daire Başkanlığı, 2017).

Boyutunun küçüklüğü ve mini-laboratuvar gibi çalışmasıyla uygulamada sağladığı kolaylık sebebiyle mikroakışkan çip ticari bir ürün olmaya oldukça uygundur. Ayrıca aynı sebeplerle point-of-care sistemine de rahatlıkla uyarlanabilir. Biyosensörün cam seviyesinde

birakılmayarak mikoakışkan çip haline dönüştürülmesi projeyi bir laboratuvar deneyi olmaktan çıkarıp ürün seviyesine taşıyacaktır. Ayrıca mikroakışkan çip formu, cam formunun yarattığı lojistik ve zorlu saklama koşullarını büyük oranda iyileştirir. Ek olarak tasarlanan biyosensör, alandaki eksiklik ve problemlere çözüm getirdiğinden biyosensöre tüketicinin talebi olacaktır dolayısıyla ticaretin temel koşulu olan arz-talep ilişkisi oldukça güçlüdür. Daha güvenilir ve hızlı sonuç vermesi, non-invaziv olması, düşük maliyeti ve tek çipte aynı anda birden fazla örnek çalışabilmesi gibi nedenlerle de diğer ticari tanı testlerine göre daha avantajlıdır.

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

Proje 2020 Eylül ayında başlamış, 2022 Mart ayına kadar devam etmiştir ve hala da sürdürülmektedir. Projenin toplam bütçesi 13.500 TL'dir. Bütçe ve zaman planlaması ile ilgili detaylar aşağıda verilmiştir (Şekil 13):

	2020				2021								2022									
	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık	Ocak	Şubat	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık	Ocak	Şubat	Mart	Nisan	Mayıs	
Literatür Taraması	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Laboratuvar Çalışması			X	X	X	X							X	X	X	X	X					
Veri Analizi			X	X	X	X							X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Rapor Yazımı				X	X	X							X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Mikroakışkan Çip Tasarlanması																	X	X	X			
Dönemsel Harcama Planı (Detaylar ayrıca verilmiştir.)			Anti ve hedef miRNA-155	Aurik Asit								Anti ve hedef miRNA-155 ve miRNA-125b										

Şekil 13. Proje Zaman Planlaması

Malzeme Listesi (4.1 Malzemeler başlıklı bölümde detaylandırılmıştır.) :

Lamel (Isolab): Sülfürik asit (H_2SO_4 , Sigma Aldrich), Hidrojen peroksit (H_2O_2 , Sigma Aldrich), Aminopropyltriethoxysilane (APTES, Sigma), potasyum karbonat (K_2CO_3 , Sigma Aldrich), polietilen glikol (PEG, Laysan Bio, Inc), sodyum borhidrür ($NaBH_4$, Sigma Aldrich), trimetil amonyum bromür (CTAB, Alfa Aesar), L-askorbik asit (Fluka), toluen (Sigma Aldrich), etanol (Sigma Aldrich), EDC molekülü ((3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, Sigma Aldrich), Sulfo-NHS molekülü, (N-hydroxysulfosuccinimide) (Thermo Scientific), -OH uç gruplu molekül (Triethylene glycol mono-11-mercaptopundecyl ether, Sigma Aldrich), -COOH uç gruplu molekül (23-(9-Mercaptononyl)-3,6,9,12,15,18,21-heptaotricosanoic Acid, Sigma Aldrich), ultra saf su ve pipet, erlen vb. her türlü laboratuvar araç-gereci İYTE Biyomühendislik Laboratuvarı

stoklarından (ücretsiz) temin edilmiştir. Kalan malzemelere ilişkin bilgiler Şekil 14’te verilmiştir.

MALZEME	HARCAMA (alışm yılı)
Aurik asit (HAuCl ₄ , Alfa Aesar):	4584,9 TL (2020)
miRNA’lar (HPLC, Biomers, Almanya)	
hedef miR-155:	711 TL (2020) 809 TL (2021)
amin modifiyeli anti- miR-155:	1232,1TL (2020) 1369 TL (2021)
miR-125b-5p primeri:	809 TL (2021)
TOPLAM BÜTÇE: 13.500 TL	HARCANAN: 9.515 TL
PROJENİN OLASI İLERİ AŞAMALARI İÇİN KALAN BÜTÇE: 3.985 TL	

Şekil 14. Harcama Detayları

Cam biyosensörün geliştirilmesinde kullanılan tüm malzemeler hesaba katıldığında (İYTE Biyomühendislik Laboratuvarı stoklarından ücretsiz temin edilen malzemelerin güncel fiyatları da dikkate alınarak) tek bir cam biyosensörün güncel üretim maliyeti 30 TL gibi oldukça düşük bir değerdir. Üstelik Şekil 10 a ve b ile kanıtlandığı üzere biyosensör yüzey dağılımı homojendir dolayısıyla biyosensör boyutları rahatlıkla küçültülebilir ve maliyet daha da düşürülebilir. Bunun yanı sıra 30 TL, Down sendromu tarama testinin maliyeti olarak düşünülmemelidir, bu yalnızca biyosensörün maliyetidir. Tasarım aşamasındaki mikroakışkan çipler, tek bir cam biyosensör üzerinde 3 ayrı test uygulayabilecektir. Ayrıca bunu çok daha düşük örnek hacmiyle yapabilecektir. Dolayısıyla tarama testinin maliyeti daha da düşük olacaktır.

Mevcut teşhis yöntemlerinden cffDNA analizinin güncel bedeli 2500-3500 TL’dir. Üçlü test gibi rutin testler ise 250-500 TL gibi ücretler karşılığında uygulanmaktadır. Görüldüğü üzere projedeki maliyet (30 TL) mevcut yöntemlerin maliyetlerinden çok düşüktür. Aralarında yaklaşık 10 ila 100 kat arasında değişen çok büyük bir fiyat farkı bulunmaktadır. Geliştirilen biyosensörün maliyet avantajı dışında da mevcut yöntemlere göre avantajlı birçok özelliği bulunmaktadır. Mevcut yöntemlerde sonuç alma süresi 10 güne kadar ulaşır ancak projede geliştirilen biyosensör 60 dk.da sonuç verir. Mevcut yöntemlerden ikili, üçlü test gibi rutin testlerin spesifite ve sensitiviteyi standartların altındadır dolayısıyla güvenilir değildir. Projede ise geliştirilen biyosensör nükleik asit komplementerizasyonu temelinde çalışır dolayısıyla verdiği sonuçlar oldukça güvenilirdir. Ayrıca amniyosentez gibi invaziv yöntemler anne ve bebek için sağlık riski taşımakta enfeksiyonlara hatta düşüklere sebep olmaktadır. Buna karşılık geliştirilen biyosensör maternal kanla non-invaziv çalışır, sağlık riski oluşturmaz (Chard ve Macintosh, 1995; Brennand ve Cameron, 2001; Heywood ve ark., 2011; Erba ve Pınar, 2015; Shajpal ve Siddiqui, 2017; Akbağ ve ark., 2018; Köşüş ve Köşüş, 2021; Galen,2022).

8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar)

Down sendromunun erken ve doğru teşhisi gerek gebeliğin sonlandırılması veya devamı konusundaki karar gerek gebeliğin Down sendromuna uygun tıbbi takibi gerek doğum sonrası planlama ve hazırlık için çok önemlidir. İleri maternal yaş ve ailede kromozom anomalisi geçmişi DS riskini arttırmaktadır (Erbaba ve Pınar, 2015). Tüm bu nedenlerle projenin hedef kitlesi 35 yaş üstü gebelik, ailede kromozom anomalisi geçmişi olan gebelikler başta olmak üzere tüm gebelerdir. Projede tasarlanan mikroakışkan çipin hamilelerce kullanılması ve uzmanlarca incelenmesi hedeflenmiştir. Her ne kadar erken teşhis (ilk trimester) önerilse de geliştirilen mikroçip hamileliğin her aşamasında çalışabildiğinden hedef kitlesi olan gebelerde hamileliğin belli bir trimesterde olma şartı aranmamaktadır.

9. Riskler

Öncelikle her tıbbi işlemde olduğu gibi biyosensörde kullanılacak maternal kan numunesinin alınması sırasında çok düşük olsa da tıbbi risk vardır.

Biyosensörün soğuk zincirde taşınması ve saklanması gerekmektedir. Soğuk zincirin kırılması durumunda biyosensörlerin bozulma riski bulunmaktadır dolayısıyla soğuk zincire dikkat edilmelidir.

LSPR görüntüleme sistemi her laboratuvarında bulunan ışık mikroskopunun LSPR cihazıyla modifiye edilmiş halidir. Ancak LSPR cihazı henüz her laboratuvarında mevcut değildir (Damborský ve ark., 2016). Buna karşın LSPR cihazı son yıllarda çok büyük bir hızla yaygınlaşmaktadır dolayısıyla da bu problemin önümüzdeki birkaç yıl içerisinde kolaylıkla çözüleceği öngörülmektedir.

Her ne kadar biyosensörün güvenilirliği nükleik asit komplementerizasyonunun kullanılması ve yapılan deneylerle *in vitro* kanıtlanırsa da etik sebeplerle gerçek kan ile popülasyon üzerinde deney yapılamamıştır. Gerçek kanla deney yapılamaması nedeniyle öngörülemeyen olası hata payı, miR-155 dışındaki DS'ye spesifik diğer miRNA'ların biyosensöre konjugasyonu ve numunenin bu miRNA'larda da denenmesiyle aşılabılır.

10. Kaynaklar

- AKBAĞ, N. N. A., Tokat, M. A., ve Çiçek, Ö. Ç. (2018). Non-İnvaziv Prenatal Testlerde Güncel Yaklaşımlar: Hemşirelik, Danışmanlık ve Etik. Jinekoloji-Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi, 17(1), 301-304. Erişim tarihi: 10.11.2020. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/1030182>
- BİLİM, TEKNOLOJİ VE YENİLİK POLİTİKALARI DAİRE BAŞKANLIĞI. (2017). *Teknoloji Hazırlık Seviyesi (THS) bilgilendirme*. TÜBİTAK. Erişim tarihi: 08.03.2022. Erişim adresi: https://www.tubitak.gov.tr/sites/default/files/2204/tr1_tubitak_4.pdf
- BRÁS, A., RODRÍGUES, A. S., GOMES, B., ve RUEFF, J. (2018). Down syndrome and microRNAs. *Biomedical Reports*, 8(1), 11-16. Çevrimiçi ön yayın. doi:10.3892/br.2017.1019
- BRENNAND, J. E., ve CAMERON, A. D. (2001). Current methods of screening for Down syndrome. *The Obstetrician & Gynaecologist*, 3(4), 191-197. Çevrimiçi ön yayın. doi:10.1576/toag.2001.3.4.191
- CAO, J., SUN, T., ve GRATAN, K. T. (2014). Gold nanorod-based localized surface plasmon

- resonance biosensors: A review. *Sensors and actuators B: Chemical*, 195, 332-351. Çevrimiçi ön yayın. doi:10.1016/j.snb.2014.01.056
- CHEN, J. S., CHEN, P. F., LİN, H. T. H., & HUANG, N. T. (2020). A Localized surface plasmon resonance (LSPR) sensor integrated automated microfluidic system for multiplex inflammatory biomarker detection. *Analyst*, 145(23), 7654-7661. Çevrimiçi ön yayın. doi:10.1039/d0an01201g
- DAMBORSKÝ, P., ŠVÍTEL, J., ve KATRLÍK, J. (2016). Optical biosensors. *Essays in biochemistry*, 60(1), 91–100. Çevrimiçi ön yayın. doi:10.1042/EBC20150010
- ERBABA, H., ve PINAR, G. (2015). The usage and current approaches of cell free fetal DNA (cffDNA) as a prenatal diagnostic method in fetal aneuploidy screening. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(4). Çevrimiçi ön yayın. doi:10.5799/ahinjs.01.2015.04.0560
- ERTUGRUL, I. (2020) *Mikroakışkan Çiplerin Biyomedikal Uygulamaları*. Erişim tarihi: 15.01.2022. Erişim adresi: https://www.researchgate.net/profile/Ishak-Ertugrul-2/publication/347964746_Mikroakiskan_Ciplerin_Biyomedikal_Uygulamalari/links/5fea774f92851c13fecfd030/Mikroakiskan-Ciplerin-Biyomedikal-Uygulamalari.pdf
- ERTURK, B., Karaca, E., Aykut, A., Durmaz, B., Guler, A., Buke, B., ... ve Kazandi, M. (2016). Prenatal evaluation of MicroRNA expressions in pregnancies with down syndrome. *BioMed research international*, 2016. Çevrimiçi ön yayın. doi:10.1155/2016/5312674
- FISCHER, M. J. (2010). *Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach*. In *Surface plasmon resonance* içinde (55-73). New York: Humana Press.
- GALEN. Üçlü tarama testi fiyatları 2022. (2022, January 12). Erişim tarihi: 08.03.2022. Erişim adresi: <https://www.galenlab.com.tr/uclu-tarama-testi/#:~:text=Devlet%20%C3%B6zel%20hastanelerde%20%C3%BC%C3%A7%C3%BC%20tarama,ile%20500%20TL%20aras%C4%B1nda%20seyreder.>
- HEYWOOD, W. E., MADGETT, T. E., WANG, D., WALLINGTON, A., HOGG, J., MILLS, K., ve AVENT, N. D. (2011). 2D DIGE analysis of maternal plasma for potential biomarkers of Down Syndrome. *Proteome science*, 9(1), 56. Çevrimiçi ön yayın. doi:10.1186/1477-5956-9-56
- JANA, N. R., GEARHEART, L., ve MURPHY, C. J. (2001). Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template. *Advanced Materials*, 13(18), 1389-1393. Çevrimiçi ön yayın doi:10.1002/1521-4095(200109)13:18<1389::AID-ADMA1389>3.0.CO;2-F
- JEONG, S., PARK, J., PATHANÍA, D., CASTRO, C. M., WEISSLEDER, R., ve LEE, H. (2016). Integrated magneto–electrochemical sensor for exosome analysis. *ACS nano*, 10(2), 1802-1809. Çevrimiçi ön yayın. doi:10.1021/acsnano.5b07584
- KEHLER, L., BÍRO, O., LAZAR, L., RÍGO, J., ve NAGY, B. (2015). Elevated hsa-miR-99a levels in maternal plasma may indicate congenital heart defects. *Biomedical reports*, 3(6), 869-873. Çevrimiçi ön yayın doi:10.3892/br.2015.510
- KÖŞÜŞ, A., ve KÖŞÜŞ, N. (2021, February 6). Fetal DNA testi fiyatı 2022 Ankara. *Jinekolog*

Ankara. Erişim tarihi: 08.03.2022. Erişim adresi: <https://jinekologankara.com/fetal-dna-testi-fiyati-2019-ankara/#:~:text=Fetal%20Dna%20Testi%202022%20Fiyat%C4%B1,3500%20tl%20aras%C4%B1nda%20%C3%BCcret%20de%C4%9Fi%C5%9Fmektir.>

- LİM, J. H., KİM, D. J., LEE, D. E., HAN, J. Y., CHUNG, J. H., AHN, H. K., ... ve RYU, H. M. (2015). Genome-wide microRNA expression profiling in placentas of fetuses with Down syndrome. *Placenta*, 36(3), 322-328. Çevrimiçi ön yayın. doi:10.1016/j.placenta.2014.12.020
- LÍOPO, A. V., CONJUSTEAU, A., ve ORAEVSKY, A. A. (2012). PEG-coated gold nanorod monoclonal antibody conjugates in preclinical research with optoacoustic tomography, photothermal therapy, and sensing. In *Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing 2012* (Vol. 8223, p. 822344). International Society for Optics and Photonics. Çevrimiçi ön yayın. doi:10.1117/12.910838
- MARINAKOS, S. M., CHEN, S., ve CHÍLKOTÍ, A. (2007). Plasmonic detection of a model analyte in serum by a gold nanorod sensor. *Analytical chemistry*, 79(14), 5278-5283. Çevrimiçi ön yayın. doi:10.1021/ac0706527
- MAYER, K. M., LEE, S., LÍAO, H., ROSTRO, B. C., FUENTES, A., SCULLY, P. T., ... ve HAFNER, J. H. (2008). A label-free immunoassay based upon localized surface plasmon resonance of gold nanorods. *ACS nano*, 2(4), 687-692. Çevrimiçi ön yayın. doi:10.1021/nm7003734
- NÍE, L., LÍU, F., MA, P., ve XÍAO, X. (2014). Applications of gold nanoparticles in optical biosensors. *Journal of biomedical nanotechnology*, 10(10), 2700-2721. Çevrimiçi ön yayın. doi:10.1166/jbn.2014.1987
- SHAJPAL, A., ve SÍDDÍQUÍ, F. (2017). Screening for Down syndrome. *Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine*, 27(11), 333-337. Çevrimiçi ön yayın. doi:10.1016/j.ogrm.2017.08.006
- STRÍPPOLÍ, P., PELLERÍ, M. C., PÍOVESAN, A., CARACAUSÍ, M., ANTONAROS, F., ve VÍTALE, L. (2019). Genetics and genomics of Down syndrome. In *International Review of Research in Developmental Disabilities* (Vol. 56, pp. 1-39). Academic Press.
- TRUONG, P. L., KÍM, B. W., ve SÍM, S. J. (2012). Rational aspect ratio and suitable antibody coverage of gold nanorod for ultra-sensitive detection of a cancer biomarker. *Lab on a Chip*, 12(6), 1102-1109. Çevrimiçi ön yayın. doi:10.1039/c2lc20588b
- ZHOU, J., CAO, Z., PANWAR, N., HU, R., WANG, X., QU, J., ... ve YONG, K. T. (2017). Functionalized gold nanorods for nanomedicine: Past, present and future. *Coordination Chemistry Reviews*, 352, 15-66. Çevrimiçi ön yayın. doi:10.1016/j.ccr.2017.08.020