

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU+

FİKİR KATEGORİSİ

TAKIM ADI

BioTHeart

PROJE ADI

Kardiyovasküler Hastalıkların Erken Tespitine Yönelik
MikroRNA Biyobelirteçleri Kullanılarak CRISPR/Cas13 Tabanlı
Biyosensör Geliştirilmesi ve Veri Analizi

BAŞVURU ID

318153

KATEGORİ

Biyoteknoloji İnovasyonu Üniversite ve Üzeri Fikir Kategorisi

İçindekiler:

1- Proje Özeti	3
2- Problem/Sorun.....	3
3- Çözüm.....	4
4- Yöntem	
A) Cas13 Proteinin Rekombinant Üretilmesi.....	6
B) Biyosensörün Tasarımı ve Üretilmesi.....	8
C) Cihaz Tasarımı.....	10
D) Yazılım ve Ara Yüz Tasarımı.....	11
5- Yenilikçi-İnovatif Yönü.....	12
6- Uygulanabilirlik.....	13
7- Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması.....	14
8- Kullanıcılar.....	15
9- Riskler.....	16
10- Kaynakça.....	17

TEKNOFEST
HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Koroner Arter Sendromu, iskemik kalp hastalığı, kalp yetmezliği, akut arter hastalığı ve bir dizi başka kalp ve damar rahatsızlığından oluşan kardiyovasküler hastalıklar (KVH), küresel mortalitenin önde gelen nedenini oluşturmaktadır. 2017'de KVH, dünya çapında tahmini 17,8 milyon ölüme neden olmuştur, bu da 330 milyon yıllık yaşam kaybına ve 35,6 milyon yıllık bir sakatlığa tekabül etmektedir. KHV'ler, ülkemizde en sık ölüm nedenidir. Bu nedenle, KHV biyobelirteçleri tanı ve tedavi süreci için çok önemlidir. Biyobelirteç tespit talebi, biyosensör geliştirme alanında önemli bir yol açmaktadır. Hastalığı tespit etmek ve öngörmek için bu noktada hızlı, ucuz, taşınabilir, hassas, seçici ve hassas biyosensör tabanlı cihazlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlardan biri, kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) temelli biyosensörlerdir. CRISPR/Cas biyoalgılama, hedef nükleik asitlerin son derece hassas, spesifik, hızlı, uygun maliyetli ve multipleks tespitine olanak tanıyan biyosensörlerdir. MikroRNA'lar, (miRNA) KHV'ler için önemli bir biyobelirteçtir. Çalışmamızda CRISPR-biyosensörlerin geliştirilmesi için makine öğrenimi yaklaşımlarının kullanımına ve karar vermeyi desteklemek için bulut bilişim ile kablosuz iletimi için Nesnelerin İnterneti' nin (IoT) kullanımına odaklanılacaktır. Bu projede İskemik Kalp Hastalığı, Koroner Arter Sendromu ve Kalp Yetmezliği Teşhisi biyobelirteçleri olan miRNA'ların tespiti için Crispr/cas13 yöntemi ile biyosensör geliştirilecektir. Projenin amacı floresans ışımalar sayesinde tek bir cihazda 3 adet KVH türünün teşhisini sağlamaktır. Bunun için gereken miRNA'lar literatür taraması yapılarak seçilmiştir. Biyosensörde miRNA kan numunesinden tespit edilecektir. Floresans ışımalar veren sistem üzerinden alınan veriler Bioheart cihazı ile veri analiz sistemimiz tarafından sade ve anlaşılır bir şekilde hekimlerin kullanımına sunulacaktır. Projede Cas13 proteini Rekombinant DNA Teknolojisi kapsamında laboratuvarımızda üretilecektir. Yurtdışından yalnızca crRNA ve floresans proplar sipariş verilecektir.

2. Problem/Sorun:

KHV dünya çapında bir numaralı ölüm nedenidir (Bakirhan et al., 2018). Türkiye'nin 80 milyon nüfusu giderek artan bulaşıcı olmayan hastalık yüküyle karşı karşıyadır. Bulaşıcı olmayan hastalıkların toplam ölümlerin %86'sını oluşturduğu tahmin edilmektedir ve yaklaşık 5 yetişkinden 1'i erken ölmektedir. KVH'ler tüm ölümlerin yaklaşık yarısından (%47) sorumludur. 2018'de ölümlerin %19,6'sı kanserlerden, %39,7'si KVH'lardan kaynaklanmıştır. 2030 yılına kadar KVH ölüm oranının erkeklerde $\approx 2,3$ kat, kadınlarda 1,8 kat artması beklenmektedir. Türkiye, Avrupa'da en yüksek KVH ölüm oranına sahip ülkeler arasındadır ve türk kadınları en yüksek genel ölüm oranına sahiptir. KHV, kalp kası ve kalbi, beyni ve diğer hayati organları besleyen damar sistemi hastalıkları dahil olmak üzere çok çeşitli bozuklukları kapsamaktadır. Yaralanmalar, solunum yolu enfeksiyonları, beslenme yetersizlikleri ve HIV/AIDS gibi diğer ölüm nedenleri toplu olarak hala belirli bölgelerde baskın bir rol oynamaktadır, ancak bu alanlarda bile KVH artık önemli bir ölüm nedenidir (Mathers at al., 2001). İskemik Kalp Hastalığı, Koroner arter hastalığı ve Kalp yetmezliği en yaygın görülen türleridir (Kayıkcioğlu & Oto, 2020).

İskemik kalp hastalığı (İKH) dünya çapında önde gelen ölüm nedenidir. Kalp krizi, İKH'nın en yaygın ilk belirtisidir ve önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir (Teringova & Tousek,

2017). Büyük-orta büyüklükteki koroner arterlerde akışı sınırlayan tıkanma nedeniyle meydana gelmektedir. Şu anda, tüm gözlemleri karşılayan iyi tanımlanmış bir İKH patofizyolojisi değerlendirmesi yoktur ve bazen İKH vakalarının altında yatan mekanizma yanlıttıcıdır.

Bu karmaşık hastalığı daha iyi incelemek ve geleceğe yönelik bakış açıları sağlamak için, erken analiz etmek önemlidir (Severino et al., 2020). Hastanelerde İKH'nın teşhisine yönelik elektrokardiyogram anormallikleri ve kardiyospesifik troponin değerine bakılır (Lippi et al., 2013). Fakat bu test hastalığı geçirmiş hastalarda uygulanmaktadır. Erken teşhiste kullanılamamaktadır.

Koroner arter hastalığı (KAH), küresel insan popülasyonunu etkileyen başlıca kardiyovasküler hastalıklardan biridir. Bu hastalığın hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde başlıca ölüm nedeni olduğu kanıtlanmıştır. Yaşam tarzı, çevresel faktörler ve genetik faktörler, kardiyovasküler hastalık gelişimi için risk faktörleri oluşturmaktadır. Sağlıklı bireyler arasında risk faktörlerinin yaygınlığı, yakın gelecekte KAH'ın olası oluşumunu aydınlatmaktadır. KAH risk faktörleri arasında diyabetes mellitus, hipertansiyon, sigara kullanımı, hiperlipidemi, obezite, homosistinüri ve psikososyal stres yer alır (Malakar et al., 2019).

Kalp yetmezliği (KY) yaygın, sakatlayıcı ve ölümcül bir hastalıktır (McMurray et al., 2005). Ciddi morbidite ve mortaliteye yol açan kardiyak aşırı yüklenme ve yaralanmadan kaynaklanan bir klinik sendromdur (Snipelisky et al., 2019). Genellikle yaşlı nüfusu etkiler ve artan yaşam beklentisi ile kronik tıbbi durumların daha iyi yönetilmesine bağlı olarak, kalp yetmezliği olan hasta sayısının artması beklenmektedir (Gedela et al., 2015).

KHV ulusal ve uluslararası alanda insan sağlığı için büyük sorun teşkil etmektedir. Bu nedenle KHV hastalığının hızlı, kolay, ucuz ve erken teşhisi önemlidir. Bu hastalıkların tanısında Elektrokardiyogram (EKG), Ekokardiyogram, Stres Testi, Kalp Kateterizasyonu, Kardiyak Bilgisayarlı Tomografi (BT) Taraması ve Kardiyak Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) yapılır. Bu testler zaman kaybına neden olan, pahalı cihazlar kullanılan ve hastalığın belirti gösterdiğinde kullanılan testlerdir.

Kardiyak troponin T (cTnT) ve troponin I (cTnI), zamanında ve doğru tanı koymak için klinik olarak kullanılan kardiyak biyobelirteçlerdir. cTnT ve cTnI, İKH tanısında temel bir rol oynamasına rağmen, bu belirteçlerin birçoğunun duyarlılığı ve özgüllüğü düşüktür (Mair et al., 1996).

3. Çözüm

KHV tanısında hastanelerde kullanılan yöntemlere (EKG, MRG, BT vb.) erişilebilirliğin zor olması nedeni ile anlık teşhis sağlanmasında zorluklar yaşanmaktadır. Bu nedenle BioTHeart takımının çözüm önerisi ise hastalığın kandan erken tespitine yönelik tasarlanan, kısa zamanda, pratik, yeni teknolojik sistemlere uyumlu ve en önemlisi hastalık belirtisi göstermeden, ileriye yönelik tanı koyabilen hızlı tespit cihazıdır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu alandaki sorunları ortadan kaldırmak için farklı biyosensörler geliştirilmiştir (Bakirhan et al., 2018). Biyosensör, biyolojik bir bileşeni fizikokimyasal bir dedektörle birleştiren, kimyasal bir maddenin tespiti için kullanılan analitik bir cihazdır. Tanıma bileşeni biyobelirteçlerdir.

Karmaşık prosedürler olmaksızın hayati biyobelirteçlerin doğru ölçümlerini verebilen hızlı ve az maliyetli CRISPR tabanlı biyosensörler bu nedenle yüksek talep görmektedir (Deng et al.,

2019). CRISPR/Cas sistemleri, hedefleme özgünlüğü sağlamak için bir CRISPR RNA (crRNA) kullanan DNA düzenleme için güçlü araçlardır.

MikroRNA'lar (miRNA'lar), hücre biyolojisinin hemen hemen her alanında önemli bir role sahiptir. miRNA'lar gibi kodlama yapmayan küçük RNA'lar, klinik teşhiste çoklu hastalıklar için tercih edilen, serumda veya plazmada oldukça kararlı bir biçimde saptanabilen biyobelirteçler haline gelmektedir (Xu et al., 2012). KVH'ların düzenleyicisi, bağdaştırıcısı ve indükleyicisi olarak hareket eden miRNA'ların önemi iyi bilinmektedir ve potansiyel bir terapötik hedef olarak kullanımları önemlidir. miRNA'ların hastalık için biyobelirteçler olarak kullanılması mümkündür.

Meder *ve ark.* serum miRNA ekspresyonunu ölçmek için İKH hastaların periferik kan örneklerini değerlendirdi ve KVH ile bir korelasyon gözlemledi (Meder et al., 2011). Sonuçlarda miR-133a-1 seviyesinde artış olduğu sonucuna varıldı. Yapılan deney doğrultusunda İKH için miR-133a-1 biyobelirteç olarak kullanılabilir olduğu düşünülmektedir (Song et al., 2015).

Si-Si Wang *ve ark.* KAH düzensiz miRNA'ların bir meta-analizi yaparak sonuçlarında En çok rapor edilen yukarı regüle edilmiş miRNA, miR-122-5p olduğunu belirtmiştir. Yapılan deney doğrultusunda KAH için miR-122-5p biyobelirteç olarak kullanılabilir olduğu düşünülmektedir (Wang et al., 2018).

Andersson *ve ark.*, bir domuz KY modelinde miRNA ekspresyon seviyelerini değerlendirdi ve miR-122'nin kanda önemli ölçüde yukarı regüle edildiğini buldu. Minör formu olan miR-122, kalp yetmezliği için tek bir belirteç olarak iyi ayırt edici güce sahip bu çalışmada en belirgin şekilde yukarı regüle edilmiş miRNA'lar arasında olduğu düşünülmektedir (Vogel et al., 2013). Yapılan çalışmalardan yola çıkarak projede miR-133a-1, miR-122-5p ve miR-122 biyobelirteçleri kullanılacaktır.

Özetle, miRNA biyobelirteçleri kullanılarak ülkemizde **daha önce geliştirilmemiş** CRISPR/Cas13 tabanlı biyosensör geliştirilecektir. Tablo 1'de hangi hastalık türünün biyobelirteçi verilmiştir.

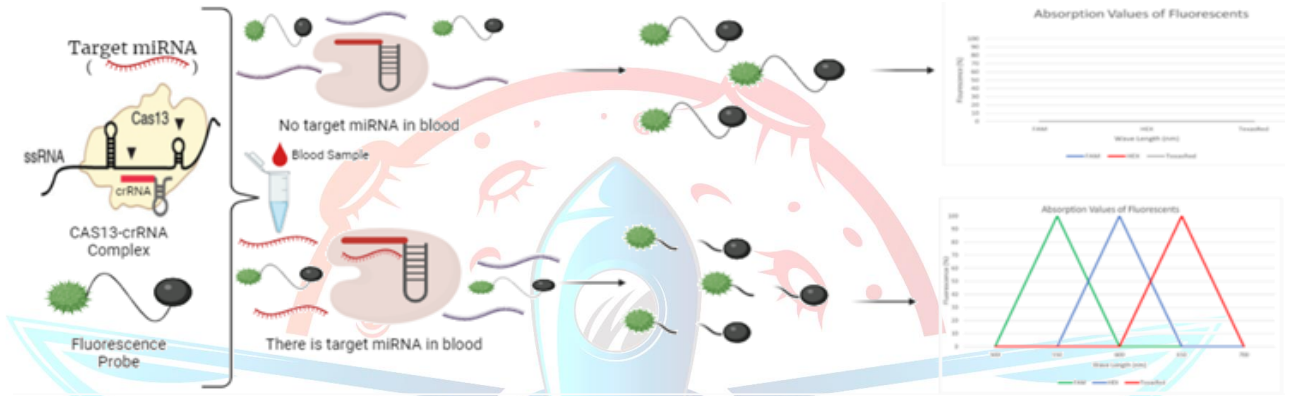
Tablo 1: Biyosensörün İçin Kullanılması Hedeflenen Biyobelirteçler ve Özellikleri

	Hastalığın Türü	Biyobelirteçi	TagMan Propları	Dalga Boyu
1	İskemik Kalp Hastalığı (İKH)	miR-133a-1	FAM	500-550nm
2	Koroner Arter Hastalığı (KAH)	miR-122-5p	HEX	550-600nm
3	Kalp Yetmezliği (KY)	miR-122	TexasRed	600-650nm

CRISPR/CAS13 kompleksine her miRNA biyobelirteğine uygun crRNA nükleotiti konulacaktır. Diğer biyosensörlerden **farklı olarak** crRNA nükleotiti kullanılması kandan miRNA'nın saflaştırılıp, PCR yaparak çoğaltılması işlemlerinin önüne geçilmesinde **maddi ve zaman açısından kazanç** sağlayacaktır. Biyosensörün çalışma prensibi şekil 1'de verilmiştir. Her hastalık türü için farklı floresans problemleri kullanılarak spesifik teşhis sağlanacaktır. TaqMan problemlerinin kullanılma nedeni diziyeye özgün olarak tasarlanabilir olmasıdır. HEX, FAM ve TexasRed boyalarının kullanılma sebebi farklı absorpsiyonlarda maksimum pik vermesidir.

Ayrıca renkleri de birbirlerinden farklıdır. Bu durumlar cihazın seçiciliğini artırır ve spesifik veriler vermesini sağlar.

Biyosensördeki işlem basamakları, veri terimi ve kontrolü, veri tabanı ve modelleme, ağ bağlantısı ve kablosuz iletişim basamaklarından geçer. Bu aşamalar gerçekleştiğinde C# programlama dili ile geliştirilen uygulama üzerinden eşzamanlı olarak veritabanı bağlantısı sağlanıp verilere kolay erişim sağlanarak grafiksel modelleme ile hastalık teşhisi sağlanacaktır. Bu uygulama üzerinden (Hasta Adı, Tc Kimlik Numarası, Hastalık Türü, Sıcaklık, Dalga Boyu, Kuyucuk) gibi seçenekler için veri girişi yapılmaktadır.



Şekil 1: Biyosensörün Çalışma Prensibi

4. Yöntem

A) Cas13 Proteinin Rekombinant Üretilmesi

A.1. Hedef Genin Seçilmesi: CAS13 proteinini kodlayan gen dizisi gerekli literatür taraması yapılarak Uniport adlı veri tabanından elde edilecektir. Belirlenen genomik dizi yapay olarak sipariş edilecektir. Laboratuvarında klonlama amaçlı kullanılan pTOL T vektörleri seçilecektir. Biyoinformatik yöntemler kullanılarak uygun restriksiyon enzimleri diziyeye eklenecektir.

A.2. Proteinlerin pTOLT Vektörüne Klonlanması: Proteinin genlerini taşıyan plazmitler elimize ulaştıktan sonra plazmitleri çoğaltmak için *E.coli DH5α* hücrelerine aktarılacaktır. *E.coli DH5α* hücrelerine transforme edilen plazmitler uygun antibiyotik içeren besiyerlerine yayma ekim yapıldıktan sonra 37 C'de bir gece inkübasyona bırakılacaktır. İnkübasyondan sonra elde edilen kolonilerden uygun antibiyotiği içeren 4 ml'lik sıvı besiyerine konularak 37 C'de bir gece inkübasyona bırakılacaktır. Büyüme gözlemlenen tüpler plazmit DNA saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırılacaktır. Elde edilen plazmitler uygun restriksiyon enzimleriyle kesilecek ve agaroz jelde koşulacaktır. Jelden proteinlerin genleri olduğu görülen bölgeler kesilerek alınır ve jelden DNA saflaştırma kiti ile saflaştırma işlemi yapılacaktır. Saf olarak elde edilen proteinlerin genleri, pTOLT vektörü restriksiyon enzimleriyle kesilecek ve ligasyona işlemine maruz bırakılacaktır.

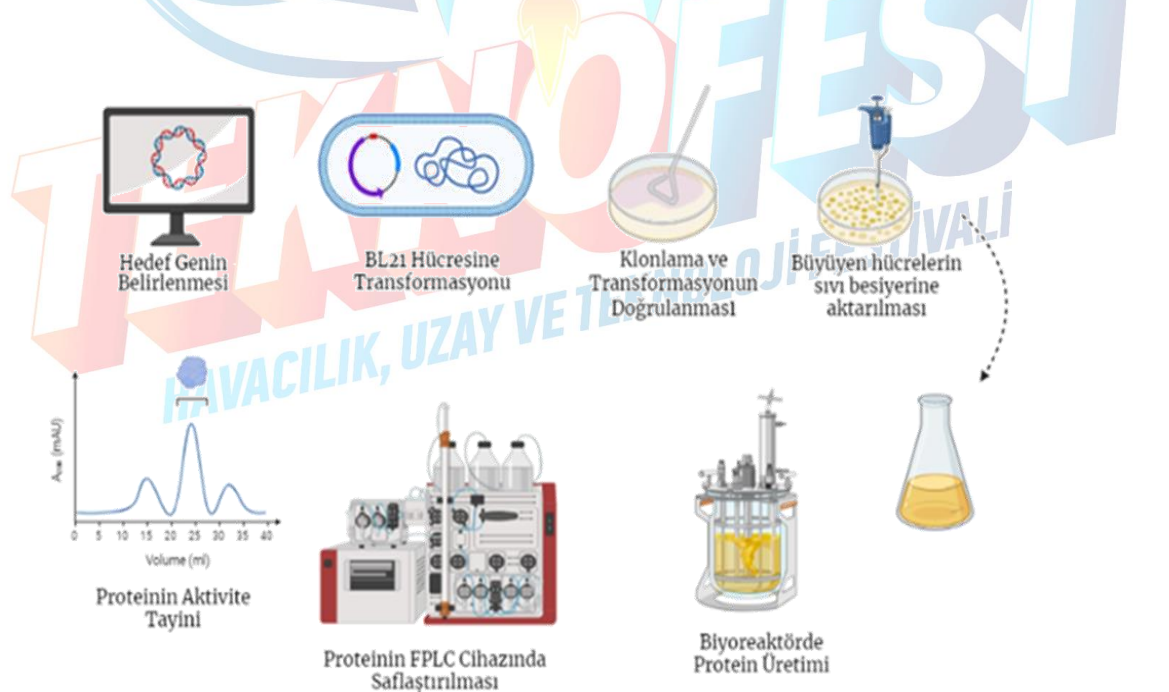
A.3. Transformasyon ve Klonlama İşleminin Doğrulama Testleri: *E.coli* hücreleri kompetent (yeterli) hale getirilecek ve transformasyon işlemi gerçekleştirilecektir. Transformasyon işleminden sonra hücre uygun antibiyotikli besi ortamına yayma ekim yapılacaktır. Transformasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirilip

gerçekleştirilmediğini anlamak için petride büyüyen hücreler sıvı kültüre alınarak çoğaltılarak ve bu hücrelerden plazmit DNA saflaştırılması gerçekleştirilecektir. Saflaştırılan plazmitler restriksiyon kesimine bırakılıp ve agaroz jelde koşulacaktır. Agaroz jel analizi sonucu pozitif olduğu düşünülen plazmitler DNA dizilemeye gönderilmek için hazırlanacaktır.

A.4. CAS13 Proteinin Ekspresyonu: DNA dizileme sonucu pozitif gelirse bu işleme başlanacaktır. *E.coli* BL21 pLysE suşu kullanılacaktır. Kompetent hale getirilen hücrelere transformasyon işlemi yapılarak uygun antibiyotikli ortamda büyümeleri sağlanacaktır. Büyüyen hücrelerden alınarak daha yüksek oranda hücre elde etmek için sıvı besiyere inoküle edilecektir. 37 C’de 1 gece inkübasyondan sonra sıvı kültürden örnekler alınarak spektrofotometrede ölçümler yapılacaktır. Yapılan ölçümler de O.D değeri yaklaşık 0,7’ye ulaştığı zaman 1 M IPTG ilave edilerek indükleme işlemi yapılacak ve besiyerleri 37 oC’de 3-4 saat inkübasyona bırakılacaktır. Besiyeri ortamı hücreler için uygun koşulların (Oksijen, asit, baz vb.) optimize olmasını sağlayan Biyoreaktör cihazında gerçekleştirilecektir.

A.5. CAS13 Proteinin Saflaştırılması: Santrifüjle toplanan hücreler, fosfat tamponu (pH: 8.00) içerisinde çözülerek sonikatörle parçalanacaktır. Ardından ultrasantrifüjle 30000 rpm de 1 saat santrifüjlenerek, karışımdaki hidrofobik proteinler ve diğer hidrofobik hücre materyalleri çöktürülecektir. Sonrasında süpernatant kısımdan afinite kromatografisi ile proteinlerin saflaştırılması gerçekleştirilecektir. Afinite kromatografisinde kolon dolgu maddesi olarak NiNTA agaroz rezin ve kolondan elüsyon için imidazol içeren Tris/HCl tamponu kullanılacaktır. Kolondan elüe edilen her fraksiyondan alınan numuneler SDS –PAGE’de analiz edilecektir.

A.6. Saflaştırılan CAS13 Proteinin Spektroskopik Analizleri: Saflaştırılan proteinlere Kütle Spektroskopisi ve CD Spektroskopisi analizleri hizmet alımı yöntemiyle yaptırılacaktır.



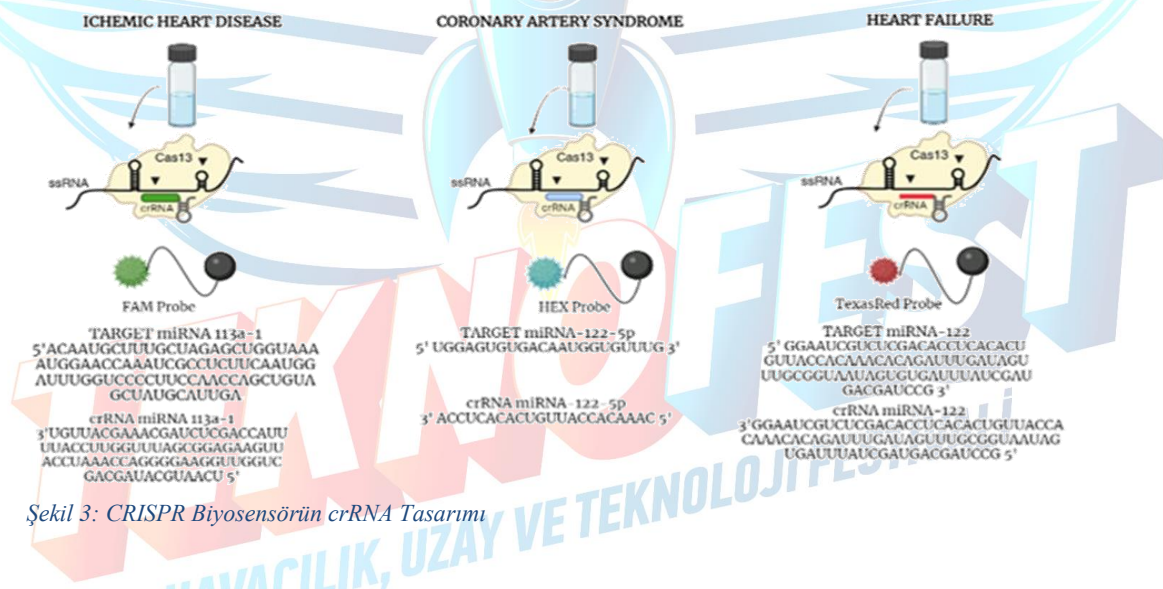
Şekil 2: Cas13 Proteinin Rekombinant Üretimi Basamakları

B) Biyosensörün Tasarımı ve Üretilmesi

B.1. CRISPR-CAS13 crRNA'nın Tasarımı

CRISPR/Cas biyoalgılama, hedef nükleik asitlerin son derece hassas, spesifik, hızlı, uygun maliyetli ve multipleks tespitine olanak tanır ve teknik uzmanlık ve karmaşık ekipmana ihtiyaç duymadan kullanımını destekler (Li et al., 2019). Son zamanlarda, yeni tanımlanan CRISPR/Cas13 sistemlerinin RNA manipülasyonunda kullanıma uygun olduğu bulunmuştur. Cas13 proteinleri, hedef RNA bölünmesine aracılık eden nükleotid bağlayıcı RNaz alanı içermektedir. Bu sayede Cas13 proteini RNA türlerini tanıyarak kesme işlemini gerçekleştirerek biyosensör olarak kullanılacaktır (Ali et al., 2018). Hedefe yönelik seçim için Cas13 proteininde crRNA bulunmaktadır. crRNA hedef miRNA nükleotitlerini tanıyarak crRNA+ miRNA kompleksi oluşturarak CAS13 proteini aktifleştirir. Aktifleşen CAS13 proteini RNAaz aktivitesi göstererek RNA'ları keser.

Bu projede her hastalık çeşidinin biyobelirteçi olan miRNA türüne özgün farklı crRNA'lar tasarlandı. crRNA'lar tasarlanırken kalıp olarak hastalık biyobelirteçleri olan miRNA'lar kullanıldı. crRNA tasarımı nygenome.com sitesinden gerçekleştirilmiştir. Tasarlanılan crRNA primerleri yurt dışından temin edilecektir. CAS13 enzimi rekombinant olarak üretimi laboratuvarımızda gerçekleştirilecektir. Şekil 3' de tasarlanılan crRNA'lar bulunmaktadır.



B.2. TaqMan Prob Tasarımı

Floresan biyosensörler, birçok hedefin yüksek hassasiyette ve seçici olarak saptanmasını sağlar ("Fluoresc. Sensors Biosens.," 2005). DNA prob teknolojisinin son zamanlarda ortaya çıkmasıyla, nükleik asitleri biyoreseptör olarak kullanan çeşitli floresan biyosensörler geliştirilmiştir. Bu prob, bir raportör grubu içeren sentetik RNA molekülleridir (belirli bir hedef molekül için tasarlanmış bir diziyeye sahip). Nükleik asitlerin kimyası iyi bilinmektedir ve bunların prob oligonükleotidlerine montajı, ticari olarak temin edilebilen sentezleyiciler kullanılarak kolaylıkla gerçekleştirilebilir (Juskowiak, 2011). TaqMan problemleri, oligonükleotid probunun 5'-ucuna kovalent olarak bağlı bir florofordan ve 3'-ucunda bir söndürücüden oluşmaktadır. Sensörde FAM, HEX ve TexasRed boya floresan boya olarak kullanılacaktır. Florofor maddede söndürücü molekül olarak biotin bu çalışmada söndürücü

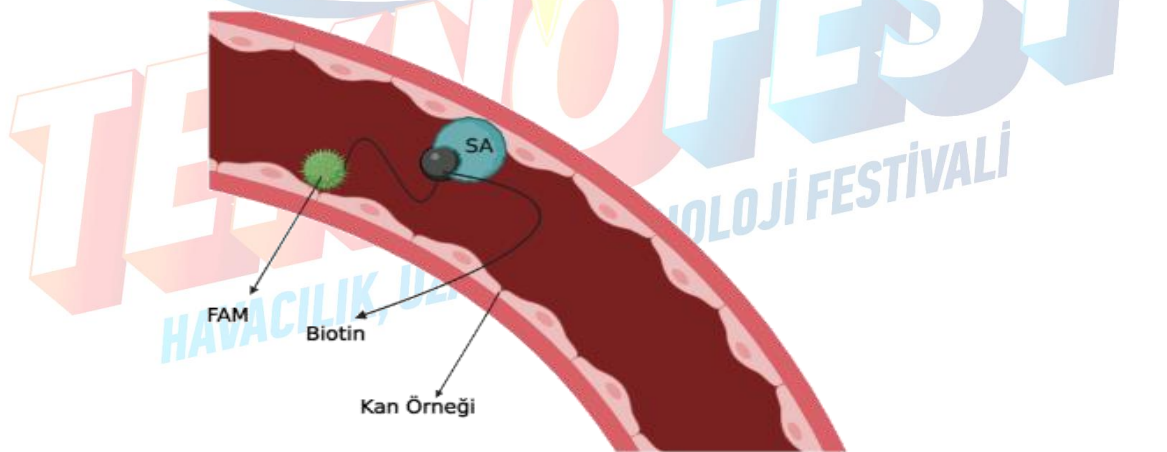
molekül olarak kullanılacaktır. Prob tasarımları idtdna.com sitesinden yapılmıştır. Tasarlanılan proplar yurtdışından temin edilecektir.

TaqMan Prob Boyası	Absorbans Aralığı	Işıma Rengi
FAM	500-550	Yeşil
HEX	550-600	Mavi
TexasRed	600-650	Kırmızı

B.3. Prob İmmobilizasyonu

Prob immobilizasyonu, sinyal yayacak olan maddenin taşıyıcıya bağlayarak veya belli bir matriks içerisinde hareketsiz bırakılması işlemidir. Yüksek hassasiyet ve seçicilik için Prob'un immobilizasyonu yapılmalıdır. İmmobilizasyon işlemi yüzey sınırlı prob üzerindeki spesifik olmayan bağlanmayı önlemek ve stabiliteyi arttırmak için gereklidir. Biyosensörlerden cevap sinyallerini alabilmek için, proplar materyallerin yüzeyine sabitlenmelidir. Floresans temelli RNA propların yüzeye sabit kalması için kovalent bağlanma metodu uygulanacaktır (Kökbaş., et al 2013).

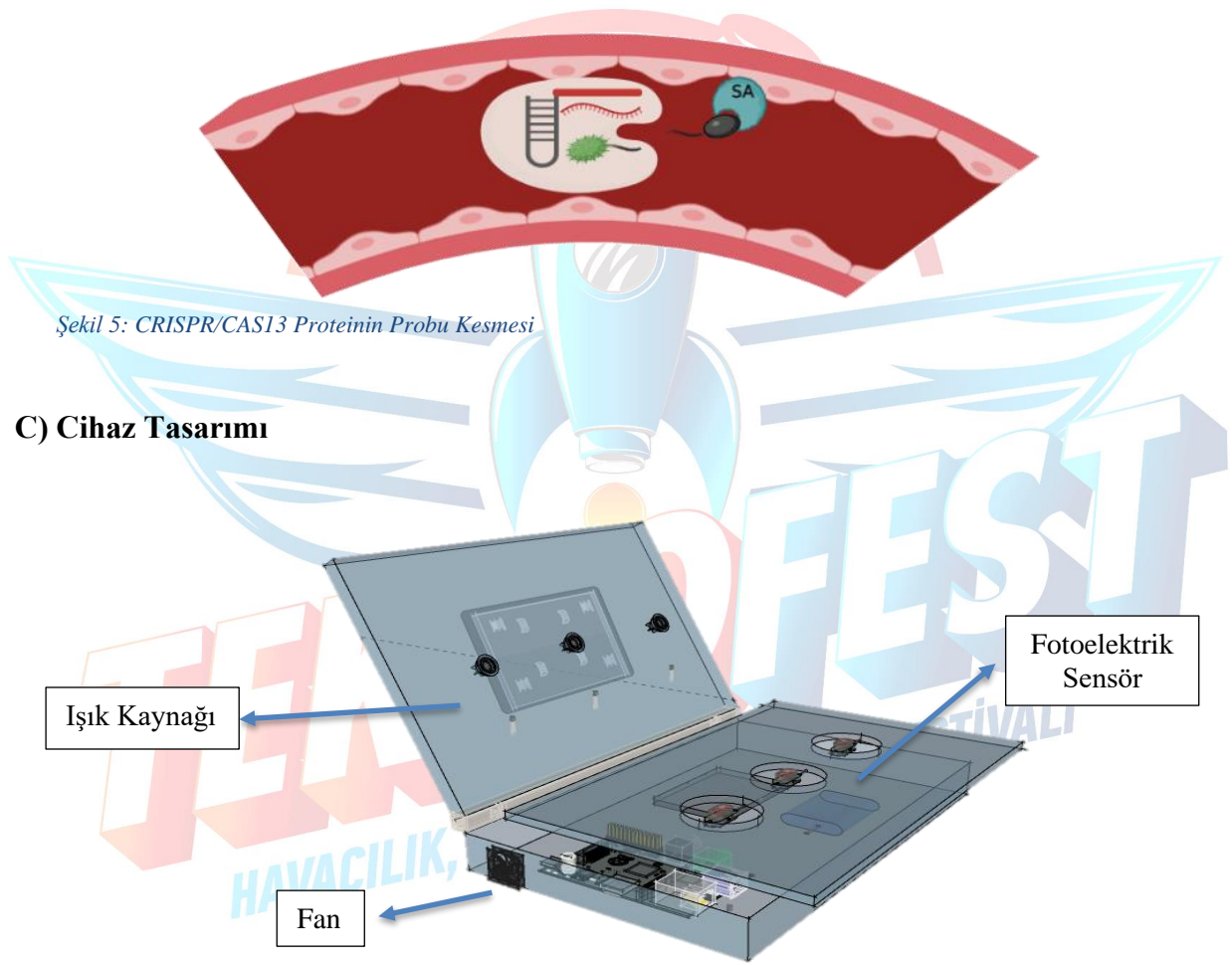
Probe immobilizasyonu 3' söndürücü uçta kovalent bağlanma metodu uygulanır (Liu et al., 2006). Güçlü streptavidin-biotin bağı çeşitli biyomolekülleri birbirine veya katı bir yüzeye bağlamakta kullanılmaktadır. İmmobilizasyon için 3' uçta bulunan biotin söndürücüsüne en kuvvetli bağlanan streptavidin (SA) seçildi. Propların kovalent bağlanma ile immobilizasyonun yapılması biyosensörün pH, iyon şiddeti, sıcaklık vb. gibi olumsuz yönde biyosensör yapısını etkileyen değişimlere karşı biyosensörün direncini artıracaktır. Şekil 4' de Prob immobilizasyonun tasarımı bulunmaktadır.



Şekil 4: Prob İmmobilizasyonu

B.4. Biyosensörün Çalışma Prensibi

Teşhisi tanımlanacak bireyden 10 mikrolitre kan örneği alınır. Hangi hastalık türü saptanacak ise kuyucukta yerine konulur. Üzerine 10 mikrolitre biyosensör solüsyonu konulur. Cihaz üzerindeki ekrandan sıcaklık, absorblanma ve hastalık türü seçenekleri seçilir. Biyosensör + kan örneği 15 dakika inkübasyona bırakılır. Bu inkübasyon sırasında alınan kan örneğinde biyobelirteç miRNA var ise miRNA + crRNA kompleksi oluşacaktır. CAS13+miRNA+crRNA kompleksi tasarlanan TaqMan floresans probu susturucudan ayrılacaktır. Ayrılan yapı cihazda bulunan farklı dalga boylarındaki ışıklar yardımıyla spektrofotometri yöntemi ile floresans ışığın absorblanma değerine bakılacaktır. Şekil 5’ de kan örneğinde CRISPR’ın nasıl gerçekleşeceği gösterilmiştir.



Şekil 5: CRISPR/CAS13 Proteinin Probu Kesmesi

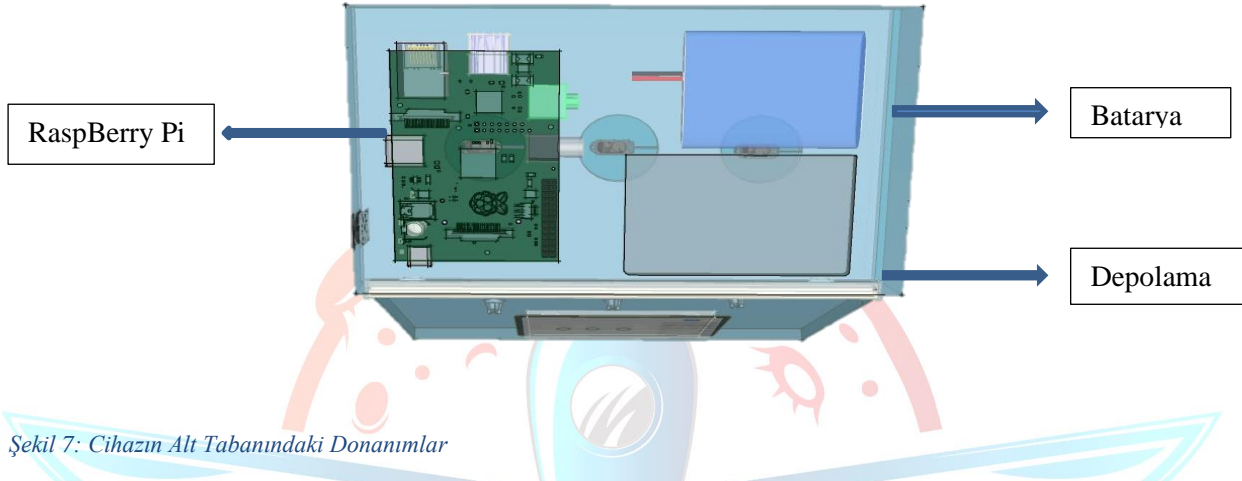
C) Cihaz Tasarımı

Şekil 6: Cihaz Tasarımı

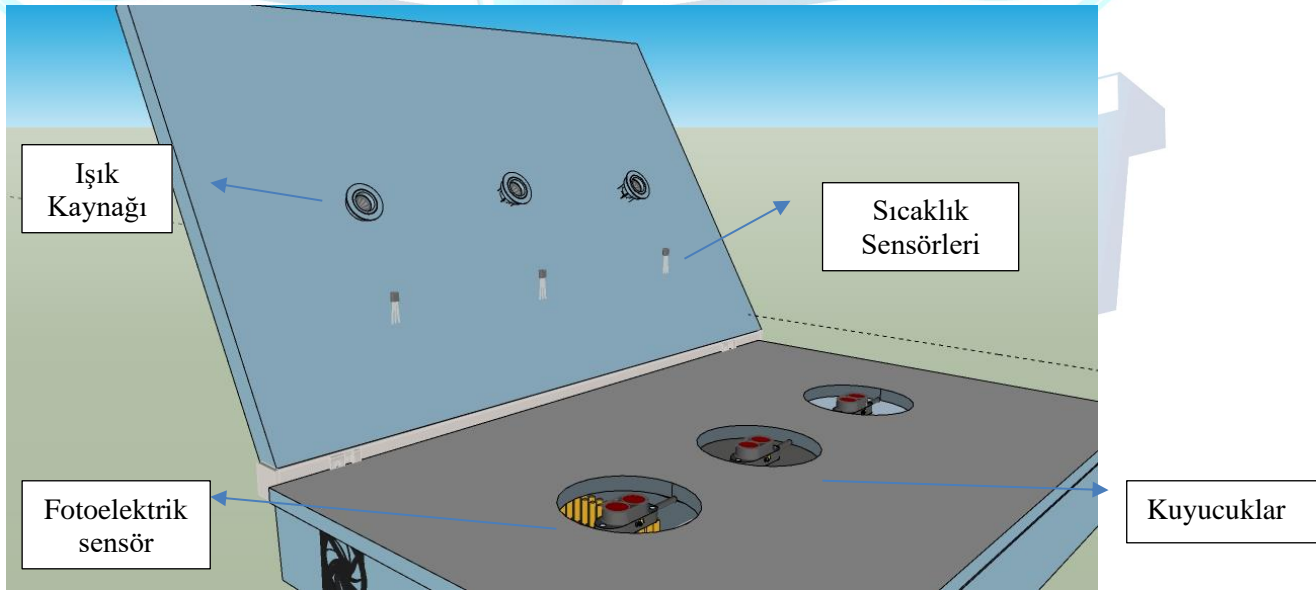
Biosensör tespit cihazımız sıcaklık sensörü, batarya, fotoelektrik sensörü, dokunmatik ekran gibi bileşenlerini tek bir parçada toplamaktadır. Kapaklı bir tasarıma sahip olan cihazımız AC bağdaştırıcından gücünü alır ve şarj edilebilir bir batarya ile güç kaynağından uzakta da kullanılabilir ayrıca taşınabilir olmaları açısından avantajlıdır. Kapak kısmında 3 adet fotoelektrik sensör ve cihaz işleyişi ile ilgili bütün işlemleri kontrol etmeyi sağlayacak olan 7” inc boyutunda bir dokunmatik ekran bulunmaktadır. Kapağın 3 adet ışık kaynağı, 2 adet sıcaklık sensörü ve izolasyon katmanı bulunmaktadır. Cihazın tabanında ise altında kan örneği ve sensör

solüsyonunun yerleştirilmesi için 3 adet değiştirilebilir daireden oluşan bir plaka RaspBerry Pi, Depolama (SD kart), Giriş/çıkış (G/Ç) bağlantı noktaları, Pil ve güç kaynağı ve Soğutucu fan bulunmaktadır. Biyosensör solüsyonu ve kan örneği kapak açılarak değiştirilebilir kuyucuklara yerleştirilmektedir. Değiştirilebilir kuyucukların olması cihazın temizlenmesinde kolaylık sağlayacaktır.

C.1. Donanımlar:



Şekil 7: Cihazın Alt Tabanındaki Donanımlar



Şekil 8: Cihazın Plakasındaki Donanımlar

C.2. Cihazın Çalışma Prensibi:

Test sırasında kuyucukta FAM, HEX, TexasRed gibi farklı dalga boylarında absorblanma değerine sahip boyalar bulunmaktadır. Eğer testi yapılan hasta KVH çeşitlerinden birine sahip ise boyalardan hastalık çeşidine göre ışık yayılacaktır. Örneğin; KAH sahip bir hasta ise ortamda HEX floresans boyası yayılacaktır. Bu boyanın absorblanma değeri max. 535nm dir. Yayılan floresans ışık, ışık kaynağı tarafından absorblanma gösterir ve fotoelektrik sensör tarafından algılanarak sisteme aktarılır. C# programlama dili ile geliştirilen uygulamamız sayesinde gelen verinin absorblanma değerine göre bireyin teyit edilen hastalığa sahip olduğu veya olmadığı anlık olarak cihaz ekranında görüntülenebilecektir. Test sırasında cihazın fanları

açık konumda olacaktır. Eğer sıcaklık çok artar ise soğutucu fanlar daha yüksek performanslı çalışacaktır. Cihazın sıcaklık değerleri Raspberry Pi tarafından kontrol edilmektedir.

D) Yazılım ve Ara Yüz Tasarımı

Sistem ile hasta ve hastalık profillerinin çıkarılması, kişiye göre ilaçların temini, hastanın geçirmiş olduğu hastalıklar ve alınacak tedbirler yürütülebilecektir. Sistem hasta, kurum, doktor ve yönetici girişleri için çok katmanlı bir mimari yapısında tasarlanmıştır. Sistem üzerindeki bilgiler daha sonra veri madenciliği yöntemleri ile sınıflandırma, kümeleme ve birliktelik kuralları ile yeni çıkarımlar yapılarak kullanılacak şekilde geliştirilmiştir.

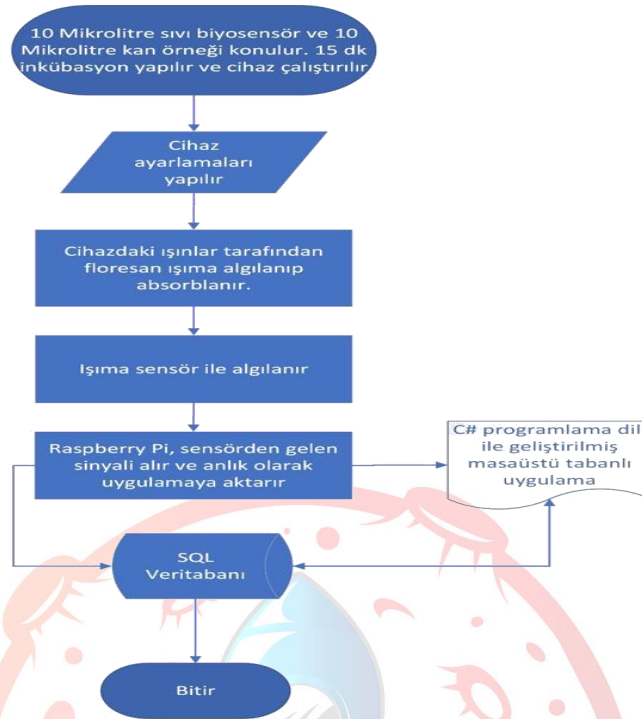
D.1. Projenin .Net tabanlı masaüstü uygulamasının geliştirilmesi

C# programlama dili ile geliştirilen uygulama sayesinde dokunmatik panel üzerinden tespit edilmek istenen KVH türü, sıcaklık, hasta örneği bulunan kuyucuklar ve kullanılmak istenen ışığın dalga boyu gibi bilgilerin girişi gerçekleştirilmektedir. Uygulama üzerinde hasta adı ve tc kimlik numarası girmek için birer Label butonu, hastalık türünü seçmek için bir Listbox, sıcaklık, dalga boyu ve kuyucuk seçimi yapmak için Radiobutton nesnelere bulunmaktadır. Alt kısımda da veri girişi yapıldığı takdirde testi başlatmak için bir başlat butonu vardır. Geliştirdiğimiz bu uygulama üzerinden cihazda test halinde olan ve test işlemi biten kuyucuklar anlık olarak cihazın üzerinde bulunan ekran üzerinden takip edilebilmektedir. Ayrıca yapılacak olan anlaşmalara bağlı olarak uygulamaya e-nabız bağlantısı eklenebilecektir.

Şekil 9: Cihazın Ara Yüz Tasarımı

D.2. Cihaz üzerinde yapılan testler sonucu elde edilen verilerin veri tabanına aktarılarak veri analizi yapılması

Bioheart hızlı tespit cihazımızın veritabanı bağlantısı Microsoft SQL ile yapılmıştır. Cihazın içinde bulunan fotoelektrik sensör ve sıcaklık sensöründen alınan veriler Microsoft Azure yardımıyla SQL veritabanına aktarılır. Bu veritabanı sayesinde hasta bilgileri anlık olarak doktorların kullanımına sunulacaktır. Bioheart cihazı ile elde edilen veriler veri analiz sistemimiz tarafından sade ve anlaşılır bir şekilde çeşitli grafiklerle görsel ve metin biçiminde hekimlerin kullanımına sunulacaktır.



Şekil 10: Cihazın Akış Diyagramı

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

1- MiRNA'lar kısa baz çiftlerine sahip oldukları için saflaştırılan miRNA'ların önce cDNA'ya PCR ile dönüştürülmesi gerekmektedir. Bizim kurduğumuz biyosensörde miRNA'lara crRNA'lar eklenecektir. Bu sayede miRNA baz uzunluğu artacak ve PCR yapmaya gerek kalmayacaktır. PCR yapmamak hem vakit hemde **düşük maliyette üretimi** sağlayacaktır.

2- CRISPR, RDT ve C# yenilikçi teknolojik yöntemler ile cihazın geliştirilmesi denenecektir. Bu durum ülkemizin yenilikçi sağlık teknolojileri alanında olumlu etkiler gösterecektir. Ulusal pazarda bu programlar ile hazırlanmış çalışma **bulunmamaktadır**. Ülkemizde **ilk kez** CRISPR tabanlı biyosensör ve hızlı tespit cihazı geliştirilecektir.

3- CAS13 proteini rekombinant yerli üretimi gerçekleştirilecektir. Bu üretim hem biyosensörün maliyetini azaltacak hem de seri üretimine katkı sağlayacaktır. Ayrıca üretilen CAS13 proteinin ve biyosensör solüsyonunun satışları gerçekleştirilerek sürdürülebilirlik sağlanacaktır. Bu sayede ülkemizin **tüketiciликten üreticiliğe** geçişini hızlandıracaktır.

4- Elde edilecek veriler kurulacak olan veri tabanında depolanacaktır. Hastalıkların tıbbi teşhisi ve hasta sinyallerinin izlenmesi için yaygın olarak kullanılan C# programı kullanılacaktır.

5- Cihazın içinde bulunan Raspberry Pi, ARM11 mikroişlemcili, kredi kartı boyutunda tek kart bilgisayardır. Bu veriler bir veri tabanında saklanır ve sadece yetkili personelin erişebileceği bir web sitesinde görüntülenebilir. Hastalıkların izlenebilmesini kolaylaştırmak için, sadece yetkili kişilerin erişimine izin veren uygulama ve web sitesi geliştirilecektir. İzleme yoluyla toplanan veriler çok değerli olduğundan ve tıp camiası tarafından **bilimsel araştırmalar** için kullanılabilirliğinden, bu sistemin gelecekte çok daha fazla kapsamı vardır.

6. Uygulanabilirlik:

BioTHeart prototip ürüne dönüştürülebilecek bir çalışmadır. Daha önce herhangi bir platformda üretimi gerçekleştirilmemiştir. İlk kez ülkemizde denenecektir. Yeni teknolojik sistemler

Kullanılacak Malzemeler	Kullanılma Amacı	Adet	Birim Fiyatı	Toplam Fiyatı
Cas13 Geni	Üretilcek proteinin geni	1	100\$	100\$
Agar	Besiyeri hazırlamada kullanılacaktır.	1	82,5\$	15 82,5\$
Agaroz	DNA moleküllerini ayırmada işleminde kullanılacaktır	1	745\$	745\$
Akrilamid	SDS-PAGE' de kullanılacaktır	1	73,75\$	73,75\$
APS (Amonyumpersülfat)	SDS-PAGE için kullanılacaktır	1	6,25\$	6,25\$
BSA (Sığır (Bovine) Serum Albümini)	Tampon bileşeni	1	1.410\$	1.410\$
DMSO	Hücreleri korumak için kullanılacaktır.	1	75,65\$	75,65\$
<i>E.coli</i> DNA ligaz ve <i>E.coli</i> DNA ligaz tamponu	Ligasyon işlemi için kullanılacaktır	1	150\$	150\$
Etanol	Genel laboratuvar kullanımı	1	50,2\$	50,2\$
Prob Tasarımları	Floresan ışık yaymak için kullanılacaktır	3 x (250 nmol)	64\$	192\$
CrRNA Primer Sentezi	Belirteçlerin CAS13'e bağlanması için kullanılacak	3	25\$	75\$
Fotoelektrik Sensörü	Işık kaynağının absorblanma değerini ölçer	3	55\$	165\$
Soğutucu Fan	Cihazın içindeki havayı soğutmak için kullanılacaktır	2	1\$	2\$
Termal Boru	Isı dağıtımı yapar	2	1\$	2\$
Sıcaklık Sensörü	Cihazın sıcaklığını ölçer	3	3\$	9\$
Işık Kaynağı	Absorblanma miktarına göre ışık verir	3	20\$	60\$
Raspberry Pi	Tek karthı bilgisayardır. Sensör verilerini gerekli yere aktarır	1	200\$	200\$
Ekran (Dokunmatik)	Cihazın kontrolünün sağlandığı parçadır	1	40\$	40\$
Depolama	Verilerin saklandığı donanım	1	41\$	41\$
Giriş/çıkış (G/Ç) bağlantı noktaları		1	3\$	3\$
Pil ve güç kaynağı	Elektrik olmadığı takdirde cihaza enerji sağlar.	1	30\$	30\$
Hosting	Web sitesinin 7/24 açık kalmasını sağlayan sunucudur.	1	10\$	10\$
Domain	Web sitesine ulaşmayı sağlayan alan adıdır.	1	5\$	5\$
				TOPLAM
				3527,35\$

8. Hedef Kullanıcılar: Türkiye, bulaşıcı olmayan hastalıklar yükü ile karşı karşıyadır ve Avrupa'da yüksek kardiyovasküler mortaliteye sahip ülkeler arasındadır (Timmis et al., 2020). Türkiye'de KVH, 1989'da %40, 1993'te %45, 2009'da %40, 2012'de %38, 2017'de %39,5, 2018'de %37,8 ve 2019'da %36,8 ile tüm ölümlerin önde gelen nedeni olmuştur (TÜİK). Nüfusun yaşlanması ve artan diyabet ve obezite oranları nedeniyle; KVH'ye bağlı ölüm oranının 2030 yılına kadar erkeklerde yaklaşık 2,3 kat ve kadınlarda yaklaşık 1,8 kat artacağı tahmin edilmektedir. Ayrıca, Türkiye şu anda Avrupa'da 50 yaşın altındaki en yüksek kalp krizi oranına sahiptir ve koroner olaydaki ortalama yaş neredeyse 10 yaş daha küçüktür (Türkiye Sağlık Bakanlığı).

BioTHeart ekibi artmaya devam eden KVH bağılı ölüm oranlarının erken önlem olarak azaltılmasını hedeflemektedir. KVH günümüzde çok sık rastlanılan bir hastalık haline gelmiştir. Bu nedenle başta risk grupları olmak üzere herkese hitap eden bir cihazdır. Tasarlanan cihazın özel ve devlet kurumu ayırımı yapılmaksızın hastaneler başta olmak üzere, tanı merkezleri ve özel kliniklerde kullanılmaya teşvik edilmesi amaçlanmaktadır.

9. Riskler:

No	En Büyük Riskler	Risk Yönetimi (B Planı)
1	Klonlama işleminin gerçekleştirilememesi	Farklı vektörler denenerek işlem tekrarlanacaktır.
2	Proteinin inklüzyon cisimciği oluşturması	Öncelikle besiyeri, sıcaklık ve indükleyici ajan (IPTG) konsantrasyonlarının değiştirilerek şaperon sistemleriyle birlikte ekspresyonu ile bu sorunun üstesinden gelinmeye çalışılacaktır.
3	Masaüstü uygulama geliştirme aşamasında teknik açıdan sorunlar çıkabilir.	Bu sorunlar göz önüne alınarak projenin masaüstü uygulamasının yapılması iş paketinde teknik sorunlar çıkması halinde hataların giderilmesi için dışarıdan teknik destek alınabilecektir.
4	Malzeme Temini Malzemeler yurt dışından geleceği için bazı gecikmeler yaşanabilmektedir.	Yurt dışından alınacak malzemeler için kargo aşamasında sorunlar çıkabileceği göz önünde bulundurularak alternatif ürünler araştırılacaktır. Herhangi bir gecikme yaşanması durumunda bu alternatifler üzerinden projeye devam edilecektir. Yurt dışından temin edilemeyen ürünler yurt içinden temin edilecektir.
5	Veritabanı Güvenliği	Veri tabanı güvenliğinin sürekli sağlanması için periyodik olarak analiz edilip verinin güvenlik önceliğine göre sınıflandırılır. Yüksek öncelik verilen güvenlik açıkları kapatılır. Güvenlik zafiyetleri için uygun bir düzeltme tespit edilir, zafiyetleri kapatmak ve sistemi güncellemek için düzenli olarak güvenlik yamaları uygulanır.

10. Kaynaklar:

- Ali, Z., Mahas, A., & Mahfouz, M. (2018). CRISPR/Cas13 as a Tool for RNA Interference. In *Trends in Plant Science*. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.03.003>
- Bakirhan, N. K., Ozcelikay, G., & Ozkan, S. A. (2018). Recent progress on the sensitive detection of cardiovascular disease markers by electrochemical-based biosensors. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 159, 406–424. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2018.07.021>
- Deng, A., Matloff, D., Lin, C. E., Probst, D., Broniak, T., Alsuwailem, M., & La Belle, J. T. (2019). Development toward a triple-marker biosensor for diagnosing cardiovascular disease. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*. <https://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.2019026532>
- Fluorescence Sensors and Biosensors. (2005). In *Fluorescence Sensors and Biosensors*. <https://doi.org/10.1201/9781420028287>
- Kökbaşı, U., Kayrın, L., & Tuli, A. (2013). Biyosensörler ve Tıpta Kullanım Alanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 22(4), 499–513.
- Juskowiak, B. (2011). Nucleic acid-based fluorescent probes and their analytical potential. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4304-5>
- Kayıkcioglu, M., & Oto, A. (2020). Control and Management of Cardiovascular Disease in Turkey. In *Circulation*. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.037606>
- Li, Y., Li, S., Wang, J., & Liu, G. (2019). CRISPR/Cas Systems towards Next-Generation Biosensing. In *Trends in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.005>
- Lippi, G., Franchini, M., & Cervellini, G. (2013). Diagnosis and management of ischemic heart disease. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1333543>
- Liu, H., Wang, H., Shi, Z., Wang, H., Yang, C., Silke, S., Tan, W., & Lu, Z. (2006). TaqMan probe array for quantitative detection of DNA targets. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gnj006>
- Mair, J., Genser, N., Morandell, D., Maier, J., Mair, P., Lechleitner, P., Calzolari, C., Larue, C., Ambach, E., Dienstl, F., Pau, B., & Puschendorf, B. (1996). Cardiac troponin I in the diagnosis of myocardial injury and infarction. *Clinica Chimica Acta*. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(95\)06168-1](https://doi.org/10.1016/0009-8981(95)06168-1)
- Malakar, A. K., Choudhury, D., Halder, B., Paul, P., Uddin, A., & Chakraborty, S. (2019). A review on coronary artery disease, its risk factors, and therapeutics. In *Journal of Cellular Physiology*. <https://doi.org/10.1002/jcp.28350>
- Meder, B., Keller, A., Vogel, B., Haas, J., Sedaghat-Hamedani, F., Kayvanpour, E., Just, S., Borries, A., Rudloff, J., Leidinger, P., Meese, E., Katus, H. A., & Rottbauer, W. (2011). MicroRNA signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction. *Basic Research in Cardiology*. <https://doi.org/10.1007/s00395-010-0123-2>
- M. S. D. Gupta, V. Patchava and V. Menezes, "Healthcare based on IoT using Raspberry Pi," 2015 International Conference on Green Computing and Internet of Things (ICGCIoT), 2015, pp. 796-799, doi: 10.1109/ICGCIoT.2015.7380571.

- Severino, P., D'amato, A., Pucci, M., Infusino, F., Adamo, F., Birtolo, L. I., Netti, L., Montefusco, G., Chimenti, C., Lavalle, C., Maestrini, V., Mancone, M., Chilian, W. M., & Fedele, F. (2020). Ischemic heart disease pathophysiology paradigms overview: From plaque activation to microvascular dysfunction. In *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms21218118>
- Snipelisky, D., Chaudhry, S. P., & Stewart, G. C. (2019). The Many Faces of Heart Failure. In *Cardiac Electrophysiology Clinics*. <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2018.11.001>
- Song, M. A., Paradis, A. N., Gay, M. S., Shin, J., & Zhang, L. (2015). Differential expression of microRNAs in ischemic heart disease. *Drug Discovery Today*, 20(2), 223–235. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2014.10.004>
- Teringova, E., & Tousek, P. (2017). Apoptosis in ischemic heart disease. In *Journal of Translational Medicine*. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1191-y>
- Timmis, A., Townsend, N., Gale, C. P., Torbica, A., Lettino, M., Petersen, S. E., Mossialos, E. A., Maggioni, A. P., Kazakiewicz, D., May, H. T., De Smedt, D., Flather, M., Zuhlke, L., Beltrame, J. F., Huculeci, R., Tavazzi, L., Hindricks, G., Bax, J., Casadei, B., ... Bardinet, I. (2020). European society of cardiology: Cardiovascular disease statistics 2019. *European Heart Journal*. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz859>
- Vogel, B., Keller, A., Frese, K. S., Leidinger, P., Sedaghat-Hamedani, F., Kayvanpour, E., Kloos, W., Backe, C., Thanaraj, A., Brefort, T., Beier, M., Hardt, S., Meese, E., Katus, H. A., & Meder, B. (2013). Multivariate miRNA signatures as biomarkers for non-ischaemic systolic heart failure. *European Heart Journal*. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eht256>
- Wang, S. S., Wu, L. J., Li, J. J. H., Xiao, H. B., He, Y., & Yan, Y. X. (2018). A meta-analysis of dysregulated miRNAs in coronary heart disease. *Life Sciences*, 215, 170–181. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2018.11.016>
- Xu, J., Zhao, J., Evan, G., Xiao, C., Cheng, Y., & Xiao, J. (2012). Circulating microRNAs: Novel biomarkers for cardiovascular diseases. In *Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0840-5>