



TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

ÜNİVERSİTE VE ÜZERİ SEVİYESİ PROJE KATEGORİSİ

TAKIM ADI

CancerThroughFlow-CaToFlow

PROJE ADI

Metastaz Öncesi Meme Kanseri Tanı Kiti

BAŞVURU ID

466312

İçindekiler

1.Proje Özeti (Proje Tanımı).....	3
2.Problem/Sorun:.....	4
3.Çözüm	5
4.Yöntem	6
5.Yenilikçi (İnovatif) Yönü.....	9
6.Uygulanabilirlik	10
7.Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması.....	10
8.Proje Fikrinin Hedef Kitlesi (Kullanıcılar)	13
9.Riskler	14
10.Kaynakça	15



1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Meme kanseri ülkemizde tüm cinsiyetlerde ikinci kadınlarda ise birinci sırada kendini göstermekte olan yaygın ancak farkındalığı diğer kanser tiplerine oranla az olan bir kanser türüdür. Projemizde meme kanseri hastaları, hastalığı atlatmış ancak takip altında olan hastalar veya genetik olarak riskli grupta bulunan insanların kendi kendilerine uygulayabileceği metastaz takibi yapan mikroakışkan prognostik bir test kiti oluşturmak amaçlanmıştır. Raporda özetten sonra problem detaylandırılacak, çözüm ve yöntem açıklanacak, yenilikçi yönü ve uygulanabilirliğinden bahsedilecek, maliyet ve saman planlaması paylaşılıp hedef kitleye ve risklere dair bilgiler verilecektir.

Projenin amacına yönelik bir mikroakışkan biyosensör sistemi fabrike edilerek üzerine son yıllarda kullanımı artan, immün cevabı oluşturmayan, biyoyumlu, hafif ve sağlam karbon nanotüp yapıları entegre edilecektir. Karbon nanotüpler; karbon yapısından oluşan grafenlerden elde edilir ve fuleren ailesine aittir. Yüzey alanı fazla olduğundan seçiciliğinin yüksek olması, elektron transferinin kolay olmasıyla hızlı yanıt vermesi ve sinyali artırması gibi elektriksel, elektrokimyasal ve optik açıdan avantaj sağlayan özelliklerinden dolayı son zamanlarda bilim dünyasında kullanımı artmış hatta keşfiyle çığır açmış bir nanomalzemedir. Karbon nanotüpler üzerine meme kanserinde en yaygın görülen biyobelirteç HER2 (kandaki hali sHER2) proteini antikoru, özellikle metastaz öncesi hem HER2 biyobelirtecine hem de birbirlerine bağımlı olarak %100'e yakın bir konsantrasyon artışı gösteren MMP-13 (Kolajenaz 3) ve CTSD (Cathepsin D) proteinleri monoklonal antikolarıyla karakterizasyon yapılacaktır. Kolajenaz ve Cathepsin D proteinlerinin kolay tespit edilmeleri dışında neredeyse bütün meme kanseri tiplerinde artış gösterdiklerinden her hastaya gerekli bilgiyi verebilecek olmaları da avantajdır. HER2, MMP-13 ve CTSD proteinlerinin karbon nanotüplere bağlı antikolarına tutunmalarıyla entegre edilecek direnç ölçerlerde proteinlerin konsantrasyonlarına ait bilgi ölçülebilecek böylece kantitatif bir analiz mümkün olacaktır. Meme kanseri test kiti, kişilerin kendi protein seviyelerinin aylık takibini yapabilmeleri içindir. Çünkü her hastanın normal protein konsantrasyonu farklı olabilmektedir. Bu anlamda aylar içindeki artışa bakılarak bir kişiye özel takip de yapılmış olacaktır.

Çip üstünde laboratuvar olarak anılan mikroakışkan sistem üretilip; karbon nanotüplerle ve HER2, CTSD, MMP-13 meme kanseri biyobelirteçleriyle karakterize edilecektir. Bu projede alan etkili transistör görevi yapacak olan karbon nanotüp malzemesi CVD (kimyasal buhar biriktirici) ile elde edilip asit pürifikasyonu yöntemiyle saflaştırılacaktır. Bu süreçte Solşdworks programından maske modellemesi yapıp silikon tabanlı mikroakışkan sistem SiO₂ ve yüzey adezyonu için foto direnç kaplaması yapıp litografi ve kazıma işlemleriyle fabrike edilecek karbon nanotüpler ve direnç kontanktları döndürerek kaplama, damla döküm veya CVD (kimyasal buhar biriktirici) yöntemleriyle tabana bağlanacaktır. Sonrasında filtreleme membranı eklenecektir. Kan hücrelerinin genellikle 7 µm çapından büyük olması entegre bir filtreleme yapılarak plazmadaki daha belirleyici bileşenlere erişim imkanı sunar. Karbon nanotüp kaplı mikroakışkan sistemin

sonrasında antikorlarla karakterize edilmesi gerekmektedir. İmmüoglobulinleri (Ig) KNT'lere konjuge etmek için EDC/NHS ara moleküllerinin bağlanması işlemi gerçekleştirilecektir. Son olarak Atomik Kuvvet Mikroskopu (AFM) ile KNT'lerin sisteme yerleşimi ve antikor yerleşiminden sonra raman spektroskopisi yöntemiyle fonksiyonu gözlemlenecektir. Oluşturulan sistemin algılama limiti (limit of detection, LOD) hedef proteinlerin insan plasma benzeri medium (HPLM)'da inkübe edilen stokları ve kan örnekleri çeşitli dilüsyon oranlarında test edilecektir.

2. Problem/Sorun

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC)'ın yayımlanmış olduğu istatistiklere göre dünyada her beş kişiden biri kanser hastalığına yakalanırken ülkemizde tüm kanser vakaları arasında meme kanserinin görülme sıklığı on kişiden birindedir. Tüm cinsiyetlerde meme kanseri en yaygın görülen ikinci kanser türü iken bu istatistik kadınlarda ilk sıradadır. Özellikle yaşla beraber risk artışı gösteren meme kanserinin kadınlarda görüldüğü ortalama yaş 63'tür. Bu bilgilerle beraber hastanelerde en yaygın kullanılan meme kanseri teşhis yöntemi olan mamografi 50 yaş üstü vakaların yalnızca %50'sinin teşhisinde efektiftir. Aynı zamanda mamografi ve meme kanseri teşhisinde kullanılan diğer görsel tarama yöntemleri (MR ve PET tarama) daha önce tedavi olmuş ve tekrarlama riskinden dolayı takibe alınmış hastalarda uygulanamamaktadır. Görüntüleme yöntemleri dışında biyopsi ve kan testleri de teşhis için kullanılmaktadır. Ancak biyopsinin vücut bütünlüğüne müdahale eden invaziv bir yöntem oluşu tercih edilen bir özellik değildir. Kan testlerinde ise yalnızca FDA onaylı biyobelirteçlere (CA 15-3, CA 27-29, HER2 ve CTC (dolaşan tümör hücreleri)) bakılmakta bu belirteçler ise meme kanserinin heterojen doğası gereği kesin sonuçlar verilmesinin önüne geçmektedir. Aynı zamanda bu biyobelirteçler meme kanseri riskiyle beraber dramatik bir artış göstermemekte ve erken aşamalarda şüpheye mahal vermektedir. Bu bağlamda seçilmiş olunan biyobelirteçler (MMP-13, CTSD ve HER2) de projenin faydasını artırmaktadır. Günümüzde hastanelerde kullanılmakta olan tüm bu yöntemleri tek başına kullanıldıklarında yanıltıcı olma riski taşıdığından meme kanseri şüphesi taşıyan hastalar bu taramaların tümü veya birkaçına aynı anda maruz bırakılmakta takip dönemindeki hastaların sıkça test olmaları gerektiği ve meme kanseri vakalarının yaşla beraber artışı göz önüne alındığında hastalar fiziken yıpranmaktadır.

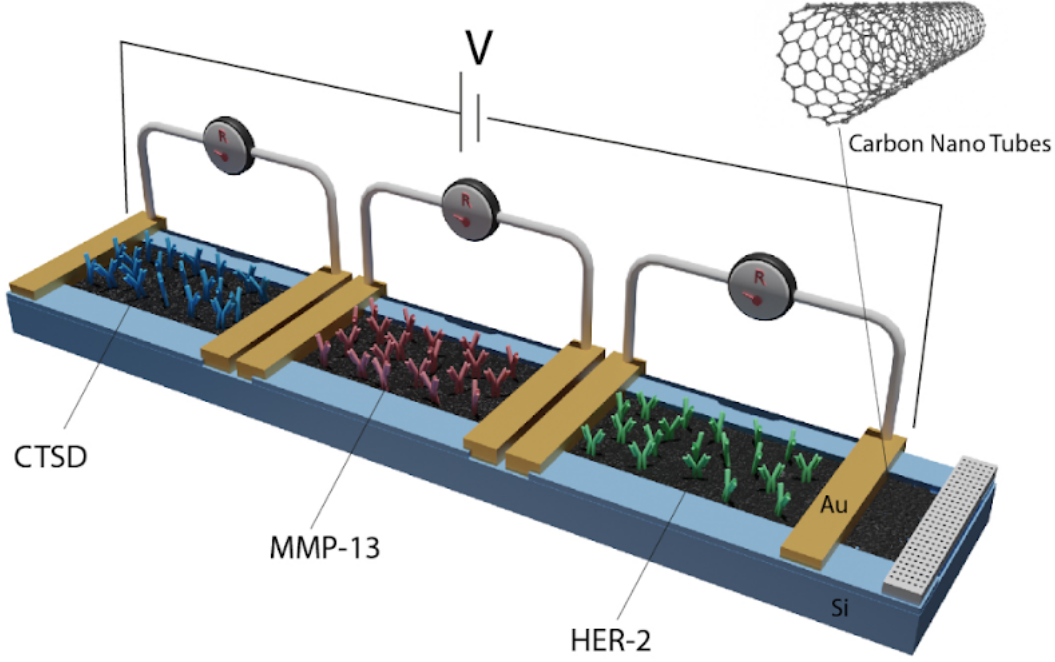
Metastaz öncesi meme kanseri tanı kiti projesinde son yıllarda kullanım ve araştırma alanı artış gösteren "point of care" bakım noktası testlerinden ilham alınmış meme kanseri riski taşıyan hastaların hastanelere gitme gereksinimi olmadan diledikleri yerde protein seviyelerini takip etmeleri hedeflenmiştir. Kanser hastalığının önünün alınmasında en büyük engellerden biri heterojen olmasıdır. Her kişinin kendine özgü bir hastalık yolağı geliştirmesi bütün topluma yapılan tedavi yöntemlerinin herkeste fayda göstermemesiyle sonuçlanır. Aynı heterojenlik meme kanserinde de geçerli olup farklı meme kanseri tiplerine özgü farklı biyobelirteçler söz konusu olmakta ve her kişinin normal protein seviyesi ile riskli protein seviyesi farklılık göstermektedir.

Dolayısıyla herkesin kendi protein seviyesinin takibini yapması doğru ve kontrollü teşhis için önem arz etmektedir.

3. Çözüm

Hedefimiz güvenilir ve kantitatif bir prognostik bakım noktası testi görevi gören mikro akışkan bir sistem ile, hastaların veya risk taşıyan kişilerin kendi hastalık ilerlemelerini takip edebilmelerini sağlamalarıdır.

Projemiz özellikle metastaz evresinde artış gösteren biyobelirteçler olan HER2, MMP13 ve CTSD'yi hedefleyen antikolar ile karakterize edilmiş Karbon Nanotüpler (KNT) ile kantitatif olarak biyobelirteç miktarını ölçmeyi planlamaktadır. Seçilen biyobelirteçlerden FDA onaylı HER2 biyobelirteci meme kanseri türleri arasında %25 oranında en sık görülen biyobelirteçtir. MMP-13 ve CTSD biyobelirteçleri birbirleri ve HER2 ile korelasyon halinde artmakta ve bütün meme kanseri tiplerinde metastaz öncesinde artış göstermekte olan proteinler olmalarıyla homojendirler. Özellikle MMP-13 (Kolajenaz 3) meme kanseriyle beraber %100 artış göstererek kitin hassaslığını ve güvenilirliğini artırmaktadır. Tespit yapılması için biyobelirteçlere özgü monoklonal antikolar kullanılacaktır. Karbon nanotüpler antikolarla karakterize edilecektir. Bu sayede ortamdaki biyobelirteçler KNT'ler üzerine yerleştirilen antikolarla yakalanacaktır. KNT'lerin elektrik akımına gösterdikleri direnç üzerlerindeki yapılarla birlikte değişmektedir. Projemizde tek duvarlı (Single-Walled) KNT'lerin üzerindeki antikoların biyobelirteçlerle etkileşime girdiğini ve de bağlanan antijen miktarını direnç değişiminin oranıyla orantılı olarak ölçmeyi hedefliyoruz. Bu amaçla bir silikon mikroakışkan sistem fabrikasyonu yapılacaktır. Maske modellemesi ardından silikon taban Si₂O ve fotodirenç kaplanacak sonrasında litografi cihazlarıyla açılan kanalın içine CVD cihazıyla altın dirençler ile karbon nanotüpler bağlanacak. Ayrıca diğer moleküllerin interferansını azaltacak filtre membran da sistemde olacak.



Figür 1: Tasarladığımız sistemin Blender 3D ile oluşturulmuş modeli. KNT'ler CTSD, MMP-13 ve HER-2 ile karakterize edilerek silisyum tabanın üstüne yerleştirilecek ve altın kontakt noktalarına dirençölçerler bağlanacak.

4. Yöntem

Karbon Nanotüp (CNT) Film Hazırlanışı

Demir nitrat ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi ile homojenize magnezyum oksit (MgO) tozu üzerinde asetilenin (C_2H_2) akışkan yataklı CVD (kimyasal buhar biriktirme) sentezi ile elde ve karakterize edilen karbon nanotüpler, İTÜ Enerji Enstitüsü Malzeme Üretim ve Hazırlama laboratuvarından temin edildi. Karbon nanotüpler nitrik asit kullanılarak saflaştırıldı. Dikloroetan ve kitosan solüsyonda kullanıma hazırlanacak.

Biyosensör Fabrikasyonu

Ürünün detaylı modellemesi ve litografi maskesinin modellemesi Solidworks programında gerçekleştirilip, sipariş edilecek. Sabancı Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi temiz odalarındaki cihazlar izinli kullanılarak fabrikasyonlar aşağıdaki gibi gerçekleşecek:

Silikon levhalar SiO_2 ile kaplandıktan sonra fotoresist kaplama ile yüzey adezyonu sağlanacak. Kanal modellenmesi için litografi yöntemi kanalların açılması içinse fotoresist ve SiO_2 katmanlarında kazıma işlemi yapılacak. Döndürerek kaplama, damla döküm veya CVD (kimyasal buhar biriktirici) yöntemleri kullanarak KNT filmleri ve metalik kaynak ve drenaj kontakları ($\text{Cr}/\text{Au} = 5/50 \text{ nm}$) silikon levha üzerine yerleştirecek. Kontaklarda beklenmeyen yan tepkileri engellemek için metal kontaklar, daha sonra ilave katmanlar ($\text{Cr}/\text{SiO}_2 = 5/50 \text{ nm}$) biriktirilerek

pasifleştirilecek.

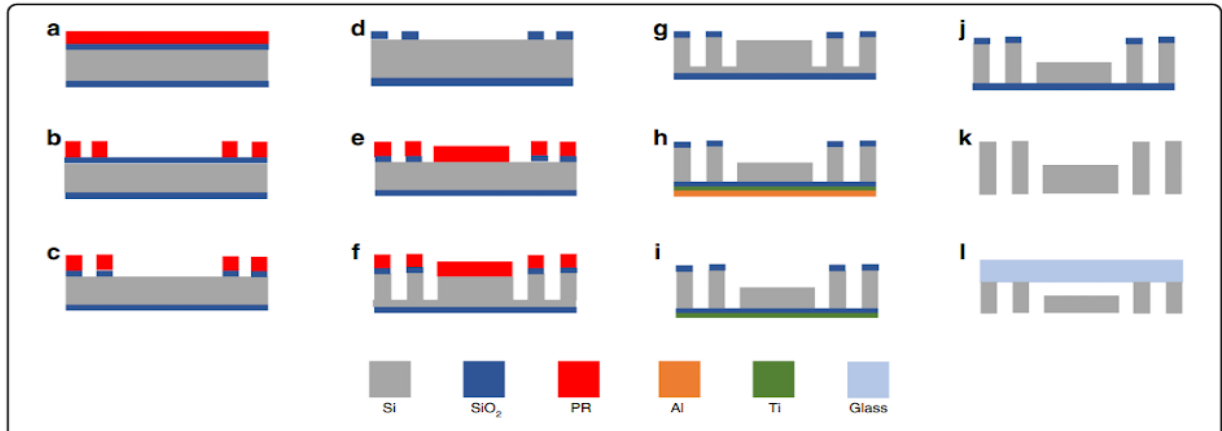


Figure 2. Mikroakışkan fabrikasyon aşamaları

Antikor Karakterizasyonu

Karboksil grubunu KNT filminin yüzeyine dahil etmek için, UV-ozon temizleyici kullanarak hazırlanan KNT cihaz dizisi ultraviyole (UV)-ozonuna maruz bırakılacak. 7 dakika ultraviyole ozon işleminden sonra her karbon nano tüpü cihazı 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilecek, bu işlem 0.1 M 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) tampon (pH 5.0) çözeltisi içinde gerçekleşecek.

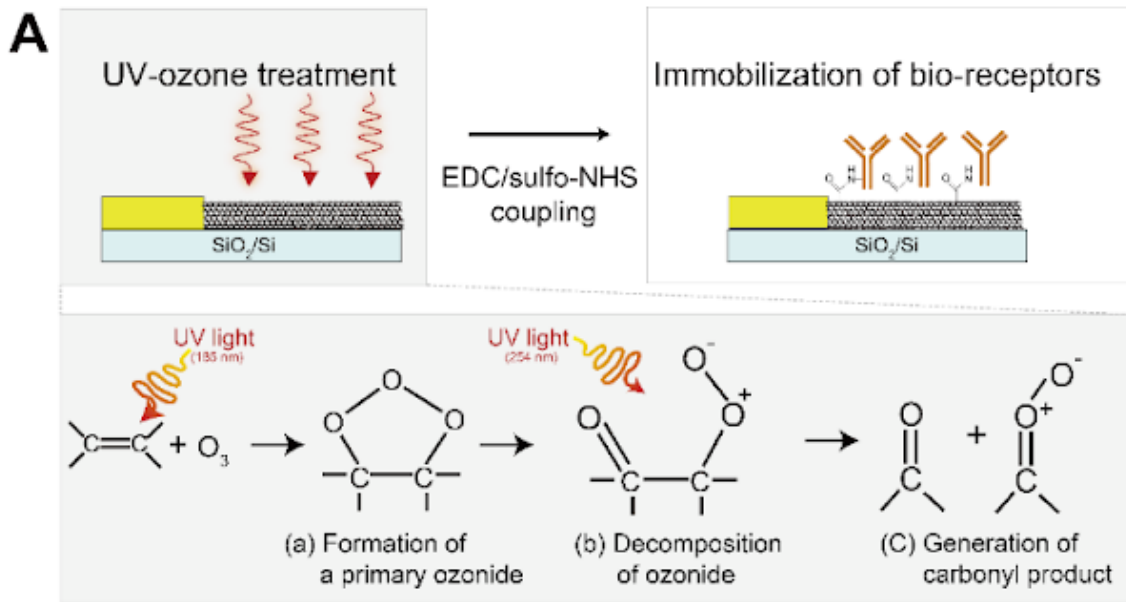


Figure 3. Karbon nanotüplerin fonksiyonel hale getirilmesi

Bu çözelti 200mM 1-ethyl-3-(3-dimethylaminoprpyl)carbodiimide ve 1M sulfo-NHE içermektedir. Daha sonra her bir KNT cihazı 10mM PBS (pH 7.4) ile yıkanarak spesifik olmayan bağlanmalar uzaklaştırılacak. Daha sonra belirlenen monoklonal antikorlarla 300ug ml⁻¹ hacminde çözelti hazırlanacak ve bu çözelti 10mM PBS içinde çözülecek. Her antikor çözeltisi sulfo-NHS fonksiyonlaşmış KNT kanallara damlatılacak ve 4C'de gece boyu inkübe edilecek. Tween 20 (0.5 wt.%20) içeren 10mM PBS içinde sensör çipi bağlanmamış antikorları uzaklaştırmak için

yıkılacak. Daha sonra 3 wt. % BSA ve 0.5 wt. Tween 20 her KNT cihazına 1.5 saat 4C'de uygulanacak.

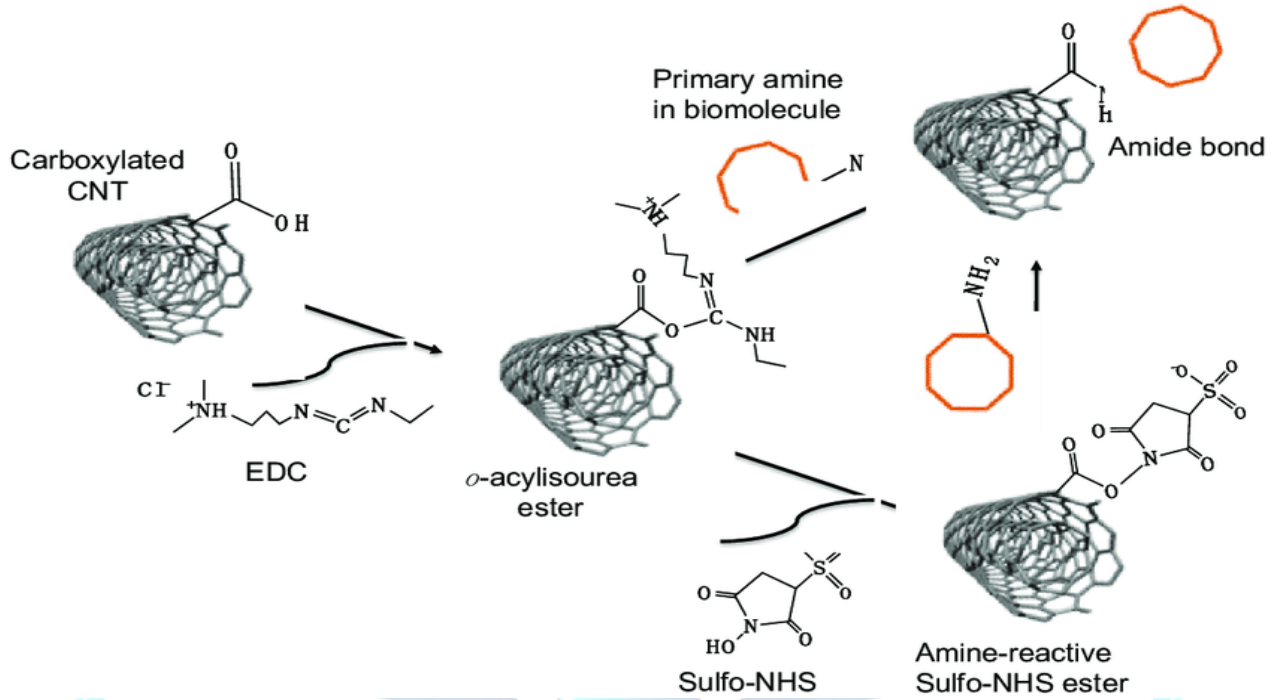


Figure 4. EDC/NHS çalışma mekanizması

Biyobelirteçler ve Ölçüm Prosedürü

1mg CTSD, HER2 ve MMP-13 480 μ L 1,1,1,3,3,3-heksafloro-2-propanol içinde çözülecek ve gece boyunca oda sıcaklığında tutulacak. Çözelti, mikrosantrifüj tüpüne dağıtılacak ve 2 saat boyunca vakumla kurutulacak. Her biyobelirtecin stok solüsyonunu bir PBS solüsyonu (10 mM, pH 7.4) kullanarak seri olarak seyrelterek femtomolar ile pikomolar konsantrasyonlarının biyobelirteçleri hazırlanacak. Her bir biyobelirteç, biyoreseptörle hareketsizleştirilmiş KNT cihazına uygulanacak ve oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilecek. İnsan plasma benzeri medium (HPLM) içinde inkübe edilen sHer-2, cathepsin D ve Kolajenaz-3 proteinleri ayrı ayrı dilüsyon oranlarında uygulanacağı gibi insan plazmasında biyobelirteçlerin tespiti için kan plazması 1/10'a seyreltilecek. 7-9 mikrometrelik membran filtreleme yapılarak, kan hücresi enterferansı engellenerek, plasmadaki biyobelirteçlerin daha hassas tespiti sağlanacaktır. Sensör çipinin direnci bir dijital multimetre kullanılarak ölçülecek.

Ölçüm ve Karakterizasyon

Bir atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve bir S-4800 mikroskobu kullanarak sentezlenmiş KNT filminin morfolojisini 10 kV'luk bir hızlanma geriliminde incelenecek. Dağılımlı Raman spektroskopu ve X-ışını fotoelektron spektroskopu kullanılarak KNT filminin UV-ozon kaynaklı işlevselleşmesini analiz edilecek.

KNT içerikli sensörün transfer eğrilerini ölçmek için, içine bir Ag/AgCl referans elektrotlu

düzenekte gözlem yapılacak. LOD (algılama limiti) ve LOQ'u (ölçüm limiti) aşağıdaki denklemi kullanarak hesaplanacak: $\kappa \times \sigma/S$, burada σ , doğrusal regresyonun artık SD'sidir (Standart Sapma), S, regresyon çizgisinin eğimidir ve κ , istatistiksel güven düzeyidir. LOD ve LOQ seviyelerini belirlemek için güven seviyeleri sırasıyla 3.3 ve 10 olarak belirlenecektir.

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Bugüne kadar meme kanseri teşhisi için bir çok yöntem kullanılmıştır. Bunlar en çok bilinenleri MRI, mamografi, kan testi ve biyopsidir. Meme kanseri teşhisinde hastanelerde en çok kullanılan yöntem ise mamografidir ancak ortalama 50 ve 50 yaş üstü vakalarda yeterince hassas sonuçlar vermemekte böyle vakaların %50'sinden azında teşhis sağlanmaktadır. MRI ile tespit yönteminde ise daha önce meme kanseri yenmiş hastalarda görüntüleme hassas sonuçlar elde edilememekle birlikte teşhis oranı %50'nin altına düşmektedir. Biyopside ise hastan alinan örnekler invaziv bir sonuç doğurmaktadır ve meme kanseri hastalarında bu olumsuz sonuçlar doğurabilmektedir. Son olarak kan testlerinde ise sadece FDA onaylı belirteçler kullanıldığı için hassasiyet sağlanamamaktadır. Çünkü FDA belirteçler artış miktarlarının radikal olmamasıyla hassas ölçüm sağlamazken bütün meme kanseri türlerine özgül değildir çoğu diğer kanser tiplerinde de görülmektedir ve kesin bir tespit yapılamamaktadır. Son yıllarda üretimi artan bakım noktası testleri (POCT) kişilerin kendi kendilerine kolay şekilde hastalık takibi yapabilmelerini sağlamaktadır. Farkındalığı diğer türlere oranla az olan ve hastaneye gitmek konusunda zorluk yaşayabilecek yaşlı nüfusta ciddi artış gösteren meme kanserinin teşhisinde ise evde test kiti avantajlı olacaktır. Seçmiş olduğumuz biyobelirteçler de bu anlamda yenilikçi ve avantajlıdır. HER2 meme kanseri türlerinde %20-25 oranında en yaygın görülen proteindir. Kollajenaz-3 (MMP-13)'ün tüm meme kanseri tiplerinde %100 arttığı kanıtlanmıştır. Bununla beraber MMP-13 ve CTSD proteinleri homojen yani kişiden kişiye değişmeyen yapılarıyla daha kolay ve güvenilir bir teşhis sunmaktadır. Meme kanserinin heterojen bir hastalık olması bulguların kişiden kişiye değişmesine neden olmaktadır. Özellikle kişiye özel tedavi fikrinin yaygınlaştığı günlerde metastaz öncesi meme kanseri tanı çipi riskli bireylerin metastaz indikatörlerinin periyodik takibini sağlayarak kişiye özel sağlık kontrolü sunmaktadır. Yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde ise meme kanseri biyobelirteçleri olarak adlandırılan BRCA1 ve BRCA2, Herr2 ve TPA biyobelirteçleri kullanılmaktadır. Bu biyobelirteçler ne kadar meme kanserine spesifik olarak düşünülse de diğer kanser çeşitlerinde de artmaktadır. Özellikle BRC1 ve BRCA2 meme kanseri teşhisinde kullanılan biyobelirteçler prostat, anemi, yumurtalık ve pankreas kanserlerinde de artış göstermektedir. Bu yüzden kesin bir tahmin yapılamamaktadır. Bu projede kullanılan belirteçler ise hassasiyet oranını arttırmak için özellikle meme kanserinde spesifik olarak artış gösteren biyobelirteçlerdir ve yukarıda da bahsedildiği gibi MMP-13 meme kanseri hastalarında %100 artış göstererek testin doğruluğunu arttırmaktadır. Ek olarak bu projede hassasiyeti ve testin doğruluğunu arttırmak daha kesin sonuçlar elde edebilmek için biyobelirteçler karbonnanotüp

üzerine entegre edilmektedir. Böylelikle bireylerden alınan kan örnekleri ile etkileşime giren biyobelirteçlerin oluşturduğu etkileşim ve elektrokimyasal transdüksiyonu karbonnanotüpler ile en hassas şekilde iletilmekte ve ölçülmektedir. Bunun daha da hassas çalışabilmesi için karbon nanotüplerin üzerinde ve projede kullanılan biyobelirteçler arasına nanoparçacıklar eklenmektedir. Böylelikle iletim ve ölçüm daha iyi seviyelere çıkarılıp testin doğruluk oranı artmaktadır. Projemizi piyasada bulunan projelerden en çok ayıran kısmı budur. Üretilecek olan çip piyasadaki birçok çipten daha hassas olacaktır. PDMS kaplama ile evde kullanıma uygun bir hale gelen mikroakışkan bir sistem olacaktır. Hastanelere gitmeye gerek kalmayacak ve insanlar kolayca kendi kontrollerini yapacaklardır. Piyasada şu anda böyle bir test yönteminin olmaması büyük bir açıktır ve bu projede üretimi çalışılan meme kanseri tanı çipi inovatif yönden insanlar için çok büyük yarar sağlayacaktır.

Meme kanseri teşhisinde güncel durumda geliştirilmiş birkaç çip vardır ancak bunlar elektriksel çipler olarak geçmektedir ve hücrelerin elektriksel özelliklerini kullanarak analiz etmektedir. Bu durumda, analiz için uygun elektronik devrelerin ve görüntüleme sisteminin olduğu bir laboratuvara ihtiyaç duyulmaktadır. Sonuç olarak, projemiz kapsamındaki bu çip metastaz indikatörlerinin periyodik takibini sağlayarak metastaz öncesi meme kanseri tanısında kişiye özel sağlık kontrolü sunmaktadır.

6. Uygulanabilirlik

Bu proje meme kanseri hastaları için point of care mantığı ile yani evde gerçekleştirilebilecek test yöntemi olarak planlanmıştır. Bu proje kullanılan biyobelirteçlerin karbon nanotüplerin üzerine entegre edilerek ve daha da geliştirilerek küçük bir kit olarak hazırlanacaktır. Kit üretimi gerçekleştiğinde alınan kan örnekleri ile ölçümler kantitatif olarak yapılacak ve testin güvenilirliği test edilecektir. Testler güvenilir sonuç verdiğinde in-vivo çalışmalara başlanacak. İn-vivo ve in-vitro testleri başarı ile tamamlayan meme kanseri tanı kiti hastalara veya hasta olma potansiyeli yüksek bireylere ulaştırılacaktır. Meme kanseri tanı kitii ile hastalar kan örneklerini çipin örnek yerine damlattıklarında testte antijen-antikör etkileşimi ile meme kanseri biyobelirteçlerindeki artış veya konsantrasyon değişimi olarak test sonuçları elde edilebilecektir. Böylelikle bireyler meme kanseri olup olmadığını rahatlıkla öğrenebileceklerdir. Bu testin herhangi bir yan etkisi veya zarar vermemesi yönünden de bireyler için hiçbir zorlayıcı ve zararlı etkisi olmayacaktır. Çalışma sonunda meme kanseri tanı kitinin daha yaygın hale gelmesi için gerekli kurum ve kuruluşlardan destek alınarak patent ve üretim sürecine girilecektir.

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

Proje kapsamında Tablo 1'de verilen iş-zaman çizelgesine göre ilk olarak hizalanmış karbon nanotüp film hazırlanacaktır. Daha sonra polidimetilsiloksan (PDMS) biyosensör fabrikasyonu gerçekleştirilecektir ve foto direnç kaplaması yapılarak litografi ve kazıma işlemleriyle kanallar açılarak

hazırlanacaktır. Bu işlemlerden sonra kandaki büyük moleküler ağırlığa sahip proteinlerin filtrelenmesi için filtre kağıdı yerleştirilecektir ve karbon nanotüpler üzerine antikor karakterizasyonu yapılacaktır. Raman spektroskobu ile hazırlanan KNT'lerin morfolojisi incelenecek ve kan testleri beraberinde LOD ve LOQ değerlerinin ölçümü sağlanacaktır. Yapılan testlerden sonra alınan sonuçlar değerlendirilip karşılaştırmaları yapılacak ve raporlar hazırlanacaktır. Daha sonraki aşamada gerekli şartlar sağlandığında bireyler üzerinde testler gerçekleştirilecektir. Proje kapsamında yapılması hedeflenen süreçlerin gerçekleştirilebilmesi için gerekli malzeme ve hizmet listesi fiyatları ile birlikte Tablo 2'de görülmektedir.

Proje kapsamında Tablo 3'de verilen dönemsel harcama planına göre karbon nanotüp film hazırlanması için gerekli maddelerin alımı ilk 3 hafta, maskenin temin edilmesi 3. ve 4. hafta olmalıdır. Biyobelirteçler ve gerekli sarf malzemeleri 6. ve 9. haftalar arası gerekmektedir ve sonraki 3 hafta içinde insan plasma benzeri medium içerisinde hedef proteinler ve kan örneklerinin alınması planlanmaktadır.

Tablo 1: İş Paketleri Zaman Çizelgesi

İP N O	İş Paketlerinin Adı ve Tanımı	HAFTALAR												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	Malzemelerin temini ve eldeki KNT'lerin tekrar optimizasyonu	X	X	X										
2	Maske Modellemesi ve maske temini			X	X									
3	Karbon nanotüp film eldesi			X	X									
4	Silikon mikroakışkan sistem fabrikasyonu karbon nanotüp entegrasyonu				X	X	X							
5	Filtre membranı ve karbon nanotüp üzerine antikor karakterizasyonu						X	X	X					
6	Mikroskop ve spektroskoplarla optimizasyon			X	X	X	X							
7	Protein LOD ve LOQ değerlerinin ölçümü							X	X	X	X			
8	Kan testleri							X	X	X	X			
9	Sonuçların değerlendirilmesi ve rapor edilmesi										X	X	X	

Tablo 2: Tahmini Maliyet Tablosu

Malzeme Adı	Fiyat
KNT	561 t1
Nitrik asit	25 t1
Dikloroethane	180 t1
Kitosan Polimer	1068t1
Si	150 t1
Au	899 t1
Cr	10 t1
PDMS	1026 t1
Membran	11.855,99 t1
Tween 20	38 t1
BSA	1094 t1
HER2	6277 t1
CTSD	5300t1
MMP-13	5.973 t1
HER2 monoklonal antikor	3460t1
CTSD monoklonal antikor	10040t1
MMP-13 monoklonal antikor	9260t1
PBS	550 t1
1,1,1,3,3,3-heksafloro-2-propanol	494,83 t1
Mikrosantrifüj Tüpü	1.708 t1
Ag/AgCl	330 t1
EDC/NHS	1224 t1

Tablo 3: Dönemsel Harcama Planı

Harcama Kalemi	HAFTALAR											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
KNT, nitrik asit, dikloroetan, kitosan	X	X	X									
Si, Si2o, Au, Cr, PDMS			X	X	X							
Membran, MES, EDC/NHS					X	X						
PBS, Tween-20, BSA, CTSD, HER-2, MMP-13, CTSD, propanol, mikrosantrifüj tüpü, AG/AgCl, Direnç Ölçer						X	X	X	X			
İnsan Plasma Benzeri Medium (HPLM), sHER2, Kolajenaz-3, Cathepsin D									X	X		
Maske			X	X								
Kan örnekleri										X	X	
Optimizasyon bitiş raporlama											X	X

8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar)

Projemiz hedef kitlesini metastaz gösteren meme kanseri riski taşıyan veya meme kanseri hasta olan ve düzenli olarak test yaptırmak zorunda olan kişiler olarak belirlemiştir. Özellikle ilerleyen yaş ile veya kötüleşen sağlık durumuyla birlikte sağlık hizmetlerine erişimde yaşanan zorlukları göz önünde bulundurarak güvenilir bir prognostik bakım noktası testine ihtiyaç duydukları belirlenmiştir.

2020 yılı istatistiklerine göre (Global Cancer Observatory, WHO) meme kanseri ülkemizde akciğer kanserinin ardından 24.175 yeni vaka ile yeni görülen kanserlerin %10,3'ünü oluşturur her cinsiyette en yaygın görülen ikinci kanserdir. Kadınlarda görülen kanserlerin %23,9'unu oluşturur.

Tüm dünyada bakıldığında ise en yaygın görülen kanserdir ve 2 milyon 261 bin 419 vaka ile tüm yeni kanser vakaların %11,7'sini oluşturur.

9. Riskler

No	MEVCUT RİSKLER	RİSK YÖNETİMİ (B PLANI)	RİSK SKORU (OlasılıkXŞiddet)
1	Yüksek maliyetli olabilecek elemanların kullanılmasının yüksek üretim sayılarında sorun oluşturması	Sistem verimliliğini etkilemeyecek alternatif elemanların belirlenmesi ve çoğu eleman için üretim yöntemi optimizasyonu sağlanması.	3 X 4 (12) Orta Derece
2	Ölçüm sonucunda elde ettiğimiz değerlerin, kesin tanı yapamayacak sonuçlar vermesi.	Testin sonuçlarının hastaların önceki sağlık verileriyle (örn. kan testleri) desteklenerek sonuç verecek bir sistem oluşturulması.	2 X 4 (8) Orta Derece
3	Kandaki diğer moleküllerin, proteinlerin spesifik olmayan bağlanmalarla ölçüm sonuçlarını etkilemesi (interferans).	Kullanılan membranın geliştirilerek, hedeflenen proteinler dışındaki yapıların filtrelenmesi.	3 X 4 (12) Orta Derece
4	Mikroakışkan sistemin özelliklerine bağlı (örn. akış hızı) gibi akışkanlar mekaniği problemleriyle karşılaşılması.	Akış (Flow) temelli bir sistem yerine, damlacık (droplet) temelli bir sistem tasarımına gidilmesi.	2 X 4 (8) Orta Derece
5	Elektriksel ölçüm hassasiyetine ulaşamama.	Daha gelişmiş elektronik devrelerle (örn. dirençölçer) sistemin evde kullanıma uygun şekilde geliştirilmesi.	2 X 4 (8) Orta Derece
6	Yeniden kullanımda ve cihazın birden fazla kişi tarafından kullanılması durumunda karşılaşılabilecek sorunlar.	Cihazla birlikte kullanılması gereken yıkama çözeltisi (wash buffer) test sonrası oluşabilecek kalıntıların giderilmesi sağlanır.	2 X 4 (8) Orta Derece
7	Kullanımda ortaya çıkabilecek, kullanıcı deneyimi sorunları.	Sistemin en uygun ve doğru kullanımı için eğitici içerikler	3 X 3 (9) Orta Derece

		hazırlanması (video eğitimler, kullanım şeması vs.)	
--	--	---	--

10. Kaynaklar

- Chang, H.J., Yang, M.J., Yang, Y.H., Hou, M.F., Hsueh, E.J., Lin, S.R. (2009). MMP13 is potentially a new tumor marker for breast cancer diagnosis. *Oncol Rep.* Nov;22(5):1119-27. doi: 10.3892/or_00000544. PMID: 19787229.
 - Garcia, M., Platet, N., Liaudet, E., Laurent, V., Derocq, D., Brouillet, J. P., & Rochefort, H. (1996). Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 14(6), 642–650. <https://doi.org/10.1002/stem.140642>
 - Hayes, B., Murphy, C., Crawley, A., & O’Kennedy, R. (2018). Developments in Point-of-Care Diagnostic Technology for Cancer Detection. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 8(2), 39. <https://doi.org/10.3390/diagnostics8020039>
 - Joseph, P., et al. (2006) Slippage of water past superhydrophobic carbon nanotube forests in microchannels. *Phys Rev Lett* 97(15):156104.
 - Karimi, M. et al. (2015a) Temperature-sensitive nanocarriers Morgan & Claypool Publishers, San Rafael.
 - Kim, K., Kim, M.J., Kim, D.W. et al. Clinically accurate diagnosis of Alzheimer’s disease via multiplexed sensing of core biomarkers in human plasma. *Nat Commun* 11, 119 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13901-z>
 - Lv, Q., Meng, Z., Yu, Y., Jiang, F., Guan, D., Liang, C., Zhou, J., Lu, A., & Zhang, G. (2016). Molecular Mechanisms and Translational Therapies for Human Epidermal Receptor 2 Positive Breast Cancer. *International journal of molecular sciences*, 17(12), 2095. <https://doi.org/10.3390/ijms17122095>.
- Masuda, H., Zhang, D., Bartholomeusz, C., Doihara, H., Hortobagyi, G. N., & Ueno, N. T. (2012). Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 136(2), 331–345. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2289-9>
- Mogensen, K.B. et al. (2011) Carbon nanotube based separation columns for high electrical field strengths in microchip electrochromatography. *Lab Chip* 11(12):2116–2118.
 - Pandey, Parijat & Dahiya, Mandeep. (2016). Carbon nanotubes: Types, methods of preparation and applications. 1. 2455-4685.
 - Rokhsar Talabazar, F., Jafarpour, M., Zuvun, M., Chen, H., Gevari, M. T., Villanueva, L. G., Grishenkov, D., Koşar, A., & Ghorbani, M. (2021). Design and fabrication of a vigorous “cavitation-on-a-chip” device with a multiple microchannel configuration. *Microsystems and Nanoengineering*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41378-021-00270-1>
- Yuca, N., Karatepe, N., & Yakuphanoglu, F. (2011). Thermal and Electrical Properties of

Carbon Nanotubes Purified by Acid Digestion. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering*, 5, 603-608.

- Vashist S. K. (2017). Point-of-Care Diagnostics: Recent Advances and Trends. *Biosensors*, 7(4), 62. <https://doi.org/10.3390/bios7040062>

