

ÖZET

APOPTOTİK SPERMLERİN BELİRLENMESİNDE KULLANIMA UYGUN BİR YÖNTEM

- 5 Mevcut buluş sperm örneği içerisinde yer alan apoptotik spermilerin, in vitro koşullarda canlı olarak ayırt edilebilmesini sağlayan bir yönteme ilişkindir.

İSTEMLER

1. Sperm numunesi içerisinde apoptotik spermilerin in vitro koşullarda belirlenmesinde kullanıma uygun bir yönteme ilişkin olup, söz konusu yöntem;
 - 5 a. Fosfatidilserin afinitesi olan bir proteinle kaplı lateks boncukların hazırlanması
 - b. Hazırlanan lateks boncuğun hazırlanmış sperm örneğiyle muamele ettirilmesi
 - c. Sperm örneğinin ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirilmesi
 - 10 d. Üzerine lateks boncuk yapışan spermilerin apoptotik sperm olarak tanımlanması.
2. İstem 1'e göre bir yöntem olup a adımı; a1) lateks boncukların ön işleme tabi tutulması ve a2) ön işleme tabi tutulan lateks boncukların fosfatidilserin afinitesi olan bir proteinle kaplanması adımlarını içerir.
- 15 3. İstem 2'ye göre bir yöntem olup a1 adımı, lateks boncuk solüsyonunun, uygun bir tampon içerisinde seyreltilmesi, oluşan karışımın santrifüj edilmesi, süpernatant atıldıktan sonra partiküllerin tekrar tamponla seyreltilerek santrifüj edilmesi, süpernatant atıldıktan sonra partiküllerin tekrar uygun bir tamponla, tercihen %2'lik solüsyon oluşturacak şekilde süspanse edilmesi adımlarını içerir.
- 20 4. İstem 3'e göre bir yöntem olup lateks boncuk solüsyonu 40 mg/ml IDC UltraClean Amidin Lateks boncuk solüsyonudur.
5. İstem 3'e göre bir yöntem olup uygun bir tampon 0.025M, pH 6 MES (2-(N-morfolinoetansülfonik asit) tamponudur.
- 25 6. İstem 2'ye göre bir yöntem olup a2 adımı, a1 adımıyla elde edilen lateks boncuk solüsyonu üzerine uygun bir tampon içinde, içerisinde 50 mg/ml oranında EDAC (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil karbodiimid) bulunan solüsyonun eklenmesi, oluşan karışıma uygun bir tampon içerisinde bulunan fosfatidilserin afinitesi olan protein eklenmesi, karışımın oda sıcaklığında 2-5 saat inkübe edilmesi, sonrasında fosfatidilserin afinitesi olan protein bağlanan lateks boncuklarla serbest proteinin ayrılması için karışımın santrifüj edilmesi, süpernatant atıldıktan sonra partiküllerin PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi/tamponu, 0.1M, pH 7.2) ile seyreltilip santrifüj edilmesi, isteğe bağlı
- 30

- olarak bu işlemin 3-4 defa tekrarlanması, süpernatant atıldıktan sonra çökelti kısmının (pellet) stoklama tamponu içerisinde süspanse edilip %1'lik konsantrasyona getirilmesi adımlarını içerir.
- 5 7. İstem 6'ya göre bir yöntem olup uygun bir tampon 0.025M, pH 6 MES (2-(N-morfolino)etansülfonik asit) tamponudur.
8. İstem 6'ya göre bir yöntem olup stoklama tamponu içerisinde %0.1 glisin, % 0.1 sodyum azid bulunan pH 7.2 değerine sahip 0,1 M PBS'dir.
- 10 9. İstem 1'e göre bir yöntem olup fosfatidilserin afinitesi olan protein; annexinler, protein kinaz C (PKC), sinaptotagmin, fosfolipaz C (PLC), rabfilin, DOC1, DOC2, MARCKS, Vinculin, Lactadherin, Gas-6, Raf-1, DGK, SK1, NO sentaz, FGF'denoluşan bir grubun içerisinde seçilir.
10. İstem 9'a göre bir yöntem olup Annexinler; insanda belirlenen 12 üyeli bir grubun içerisinde seçilir.
- 15 11. İstem 10'a göre bir yöntem olup Annexinler; Annexin tip I, Annexin tip II, Annexin tip III, Annexin tip IV, Annexin tip V (veya Annexin A5), Annexin tip VI, Annexin giardin, Annexin tip VII, Annexin tip VIII, Annexin tip X, Annexin tip XI, Annexin tip XIII, Annexin tip XIV, Annexin tip XXXI'den oluşun bir grubun içerisinde seçilir.
- 20 12. İstem 11'e göre bir yöntem olup Annexin, Annexin V'tir.
13. İstem 1-12'ye göre bir yöntem olup fosfatidilserin afinitesi olan protein florasun veya enzimatik bir izleyici veya biyotin ile konjuge olarak kullanılır.
14. Sperm numunesi içerisindeki apoptotik spermlerin in vitro koşullarda miktarının belirlenmesinde istem 1-13'e göre bir yöntemin kullanılması..
- 25 15. Sperm örneği içerisindeki sağlıklı spermlerle apoptotik spermlerin in vitro koşullarda ayrılmasında İstem 1-13'e göre bir yöntemin kullanılması.
16. Sperm numunesi içerisindeki apoptotik spermlerin in vitro koşullarda belirlenmesinde istem 1-14'e göre bir yöntemin kullanılması

TARİFNAME

APOPTOTİK SPERMLERİN BELİRLENMESİNDE KULLANIMA UYGUN BİR YÖNTEM

5 Teknik Alan

Mevcut buluş yardımıyla üreme tekniklerinde kullanılan semen örneği içerisinde yer alan apoptotik spermlerin, in vitro koşullarda canlılığını kaybetmeden ayırt edilebilmesini sağlayan bir yönteme ilişkindir.

Bilinen Teknik

- 10 Tüp Bebek olarak bilinen infertilite tedavisinde kullanılan en önemli yöntem olan mikroenjeksiyon yönteminde (ICSI- İntrasitoplazik sperm enjeksiyonu) bir sperm bir oositin içerisine mikromanipülatör yardımıyla yerleştirilmektedir.

- 15 Sperm ve oositin kalitesi embriyo gelişimi ve başarıyı direkt olarak etkileyen iki unsurdur. Oosit sayısı sınırlı olduğundan (ortalama 10) oositi seçmek mümkün olmayıp tüm oositler mikroenjeksiyon işlemi için kullanılırken sperm sayısının çok olması (ortalama 10 milyon) spermlerin seçilmesini mümkün kılmaktadır. Ancak sperm seçiminde sadece morfolojik kriterler kullanılmakta, bu da spermin genetik, metabolik, fonksiyonel durumunu yansıtmamaktadır.

- 20 Tüm hücrelerde olduğu gibi spermlerde de apoptoz mekanizması hücrenin iç dinamiklerindeki bir problem neticesinde tetiklenen bir eleme mekanizmasıdır. Programlı hücre ölümü olarak bilinen bu mekanizmanın tetiklenmesi sonucu hücre kendini yok etmektedir. Herhangi bir nedenle (genetik, metabolik ya da fonksiyonel) sağlıklı olmayan sperm iç kontrol mekanizmasını aktive ettiği için apoptoz bu iç problemleri dolaylı olarak gösteren bir mekanizmadır

- 25 Sağlıklı spermin seçilmesinde apoptoz belirlenmeyen spermlerin kullanımı sağlıklı bir spermin seçimini mümkün hale getirecektir.

- 30 Spermlerde apoptozun belirlenmesi için genel olarak apoptozun en önemli göstergeleri olan DNA fragmentasyonu ve kaspaz enzimlerinin aktivasyonları kullanılmaktadır ancak tüm bu teknikler ancak fikse edilmiş, ya da lizis edilmiş ölü spermlere uygulanabilmektedir. Bu tekniklerin uygulanması sonucu spermlerde

belirlenen apoptoz oranları belirli bir hasta için yüzde olarak verilmekte ve sadece hastayı bilgilendirmek için kullanılmaktadır.

5 DNA fragmentasyon oranının cut-off değeri olarak genellikle %30 kabul edilmekte, bu oranın üzerinde apoptoz belirlenen kişilerde fertilizasyon oranlarının, embriyo gelişiminin, embriyo kalitesinin, implantasyon, gebelik ve canlı doğum oranlarının azaldığı, abortus oranlarının ise arttığı bilinmektedir. Başarı şansının en iyi kohorta sahip çiftlerde bile %40'ı geçemediği bir tüp bebek siklusunda bu durum büyük önem arzetmektedir çünkü hastanın gebe kalamaması yeni bir siklus denenmesini zorunlu kılmakta, bu da maliyet ve zaman kaybına neden olduğu gibi, tıbbi komplikasyon olasılıklarını artırmakta, ayrıca fizyolojik, psikolojik ve sosyal açıdan çiftleri zorlamaktadır. Apoptoz oranı düşük olan ya da hiç belirlenmeyen kişilerdeki başarı şansının yüksekliği de bu durumun ispatıdır. Oysa infertilite tedavisine alınan hastaların yaklaşık yarısı erkek nedenli olup bu hastalarda apoptoz oranlarının daha yüksek olduğu bilinmektedir. Açıklanamayan infertilite olarak adlandırılan nedeni bilinmeyen infertilite grubunda da bu oranın arttığı dolayısıyla bu gruptaki hastaların büyük kısmında sorunun nedeninin bu olabileceği gösterilmiştir.

Tüm bu bilgiler ışığında sağlıklı spermin canlı olarak seçilebilmesinin mümkün olması büyük önem arzetmektedir.

20 Tekniğin bilinen durumunda canlı olarak apoptotik olan ve olmayan spermleri ayırma işlemi flow-sitometri yöntemi kullanılarak yapılabilmektedir. Ancak bu yöntemin hem demirbaş hem de kullanılan sarf malzemesinin çok pahalı olması, çok az merkezde bulunması, ekstra bir eğitim ve tecrübe gerektirmesi ve işlemin steril olmaması gibi nedenler bu yöntemin sadece araştırma amaçlı olarak kullanılmasına neden olmaktadır.

25 Mevcut durum dikkate alındığında, bir sperm numunesi içerisinde bulunan apoptotik spermleri canlı olarak işaretleyerek ayırmak için kullanılabilecek, maliyeti düşük, kolay uygulanabilir bir yönteme ihtiyaç duyulduğu görülmektedir.

30 Bu amaçla, bilinen tekniklerden farklı olarak, sadece motilite ve morfolojiye dayanan bir sperm seçim yöntemi yerine spermin metabolik, genetik ve fonksiyonel durumu ile ilgili dolaylı bilgi sahibi olunmasına elverişli bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

Buluşun Detaylı Anlatımı

Mevcut buluş, sperm örneği içerisinde apoptotik spermilerin in vitro koşullarda işaretlenmesi ve böylece apoptoz belirlenmeyen spermilerin ayırt edilmesine olanak tanıyan ışık mikroskopik bir tekniğin kullanılmasına yöneliktir.

- 5 Buluş konusu yöntem; canlı spermelerde analize olanak tanınması, apoptoz belirlenmeyen spermilerin mikroenjeksiyon (ICSI) yöntemi için seçilebilmesine olanak sağlaması, steril çalışmaya olanak tanınması, kullanım için ekstra ekipman ve eğitim gerekmemesi yönleriyle bilinen yöntemlerden ayrılmaktadır.

Buluş bir açıdan, sperm örneği içerisinde apoptotik spermilerin in vitro koşullarda belirlenmesinde kullanılacak bir yöntemle ilişkin olup, söz konusu yöntem;

- 10 a. Fosfatidilserin afinitesi olan bir proteinle kaplı lateks boncukların hazırlanması
b. Hazırlanan lateks boncuğun hazırlanmış sperm örneğiyle muamele edilmesi
c. Sperm örneğinin ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirilmesi
d. Üzerine lateks boncuk yapışan spermilerin apoptotik sperm olarak tanımlanması ve
e. İsteğe bağlı olarak lateks boncuk yapışmayan sağlıklı spermilerin seçilmesi ve
15 kullanılması adımlarını içermektedir.

Buluşun tercih edilen bir uygulamasında a) adımı; a1) lateks boncukların ön işleme tabi tutulması ve a2) ön işleme tabi tutulan lateks boncukların fosfatidilserin afinitesi olan bir proteinle kaplanması adımlarını içerir.

- 20 Buluşun tercih edilen bir uygulamasında a1) lateks boncukların ön işleme tabi tutulması işlemi; lateks boncuk solüsyonunun, tercihen 40 mg/ml IDC UltraClean Amidin Lateks boncuk solüsyonunun, uygun bir tampon içerisinde, tercihen 0.025M, pH 6 MES tamponu (2-(N-morfolino)etansülfonik asit) içerisinde, seyreltilmesi, oluşan karışımın santrifüj edilmesi, süpernatant atıldıktan sonra partüküllerin tekrar tamponla, tercihen 0.025M, pH 6 MES tamponu (2-(N-morfolino)etansülfonik asit)
25 ile, seyreltilerek santrifül edilmesi, süpernatant atıldıktan sonra partüküllerin tekrar tamponla, tercihen 0.025M, pH 6 MES tamponu (2-(N-morfolino)etansülfonik asit) ile, tercihen %2'lik solüsyon oluşturacak şekilde süspanse edilmesi adımlarını içerir.

- 30 Buluşun tercih edilen bir uygulamasında, a2) ön işleme tabi tutulan lateks boncukların fosfatidilserin afinitesi olan bir proteinle kaplanması işlemi; a1) adımı elde edilen lateks boncuk solüsyonu üzerine uygun bir tampon içerisinde, tercihen 0.025M, pH 6 MES tamponu (2-(N-morfolino)etansülfonik asit) içerisinde, 50 mg/ml oranında (örn. 2 ml MES içerisinde 100 mg EDAC) EDAC (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil

karbodiimid) bulunan solüsyonun eklenmesi, oluşan karışıma uygun bir tampon, tercihen 0.025M, pH 6 MES tamponu (2-(N-morfolino)etansülfonik asit), içerisinde bulunan fosfatidilserin afinitesi olan protein eklenmesi, karışımın oda sıcaklığında 2-5 saat inkübe edilmesi, sonrasında fosfatidilserin afinitesi olan protein bağlanan lateks 5 boncuklarla serbest proteinin ayrılması için karışımın santrifüj edilmesi, süpernatant atıldıktan sonra partiküllerin PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi/tamponu, 0.1M, pH 7.2) ile seyreltilip santrifüj edilmesi, isteğe bağlı olarak bu işlemin 3-4 defa tekrarlanması, süpernatant atıldıktan sonra çökelti kısmının (pellet) stoklama tamponu (0,1 M PBS, %0.1 glisin, % 0.1 sodyum azid, pH 7.2) içerisinde süspanse edilip 10 %1'lik konsantrasyona getirilmesi adımlarını içerir.

Burada kullanılan “fosfatidilserin afinitesi olan protein” ifadesi, bir çift katmalı lipid yapı olan ve apoptotik hücrelerin dış yüzeyinde bulunan fosfatidilserine bağlanma yatkınlığı olan proteinleri ifade etmektedir. Fosfatidilserin afinitesi olan proteinler; annexinler, protein kinaz C (PKC), sinaptotagmin, fosfolipaz C (PLC), rabfilin, 15 DOC1, DOC2, MARCKS, Vinculin, Lactadherin, Gas-6, Raf-1, DGK, SK1, NO sentaz, FGF'den oluşan bir grubun içerisinde seçilir.

Burada bahsedilen Annexinler; insanda belirlenen 12 üyeli bir grubun içerisinde, tercihen Annexin tip I, Annexin tip II, Annexin tip III, Annexin tip IV, Annexin tip V (veya Annexin A5), Annexin tip VI, Annexin giardin, Annexin tip VII, Annexin tip 20 VIII, Annexin tip X, Annexin tip XI, Annexin tip XIII, Annexin tip XIV, Annexin tip XXXI'den oluşan bir grubun içerisinde seçilebilir.

Buluşun tercih edilen bir uygulamasında fosfatidilserin afinitesi olan protein olan Annexinler, özellikle tercihen Annexin V (Annexin A5) kullanılır.

Buluşun bir uygulamasında fosfatidilserin afinitesi olan proteinler floresan veya 25 enzimatik bir izleyici veya biyotin ile konjuge olarak kullanılabilir.

Buluşu uygun yöntemin uygulanması esnasında işlemin gerçekleştirilmesine yardımcı olacak çözeltiler, örneğin su veya tekniğin bilinen durumunda uzman kişinin kolayca erişebileceği uygun tampon solüsyonları kullanılabilir.

Buluşun bir diğer unsuru buluşu uygun yöntemin bir sperm numunesi içerisindeki 30 apoptotik spermilerin miktarının belirlenmesinde kullanılmasıdır.

Buluşun bir başka unsuru buluşu uygun yöntemin bir sperm numunesi içerisindeki sağlıklı spermilerle apoptotik spermilerin ayrılmasında kullanılmasıdır.

Buluşun tercih edilen bir uygulamasında buluşa uygun yöntemle apoptotik sperm olduğu belirlenen sperm, sağlıklı spermelerden mikroskop altında seçilerek ayrılabilir.

- 5 Şimdi buluş, sadece örnek amaçlı olan ve bu buluşun kapsamını herhangi bir şekilde kısıtlar olarak yorumlanmaması gereken aşağıdaki örneklere atıfta bulunularak açıklanacaktır.

ÖRNEKLER:

Örnek 1: Annexin V Kaplı Lateks Boncuk Üretimi

A) Lateks Boncukların Ön İşleme Tabi Tutulması

- 10 Öncelikle 2,5 ml (40 mg/ml) IDC UltraClean Amidin Lateks boncuk solüsyonu 10 ml 0.025M, pH 6 MES tamponu (2-(N-morfolino)etansülfonik asit) içerisinde seyreltilir. Sonrasında partiküllerin çökmesi için karışım santrifüj edilir. Süpernatant atılır ve karışıma tekrar 10 ml MES tamponu eklenir, tekrar santrifüj edilir ve süpernatant partiküllerden ayrılıp atılır. Elde edilen lateks boncukların üzerine 5 ml MES tamponu
- 15 eklenerek boncukların süspanse edilmesiyle Annexin V kaplamaya hazır Lateks boncuklar elde edilir (%2'lik solüsyon olarak).

B) Ön İşleme Tabi Tutulan Lateks Boncukların Fosfatidilserin Afinitesi Olan Bir Proteinle Kaplanması

- 20 Hazırlanan %2'lik lateks boncuk solüsyonu üzerine MES tamponu içerisinde 50 mg/ml oranında (örn. 2 ml MES içerisinde 100 mg EDAC) bulunan EDAC (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil karbodiimid) solüsyonu eklenir. Sonrasında solüsyona 5 ml MES tamponu içerisinde Annexin V antikoru eklenir (içerisinde 5 mg antikor bulunur). Karışım oda sıcaklığında 3-4 saat çalkalanarak inkübe edilir. Sonrasında
- 25 Annexin V bağlanan lateks boncuklarla serbest Annexin V'in ayrılması için karışım santrifüj edilir. Süpernatant atılır. Çökelti kısmı (pellet) 10 ml PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi/tamponu, 0.1M, pH 7.2) içerisinde süspanse edilir. Partiküllerin çökmesi için tekrar santrifüj edilir. Bu yıkama işlemi 3-4 defa daha PBS kullanılarak tekrarlanır. Son olarak çökelti kısmı (pellet) 10 ml stoklama tamponu (0,1 M PBS,
- 30 %0.1 glisin, % 0.1 sodyum azid, pH 7.2) içerisinde süspanse edilip %1'lik konsantrasyona getirilir.

Örnek 2: Annexin V bağlı Lateks Boncuklar Kullanılarak Apoptotik Sperm Hücrelerinin Belirlenmesi

Annexin V kaplı lateks boncuk çözeltisi ile likefiye olmuş semen örneği in vitro koşullarda lam üzerinde 1:1 oranında karıştırılır ve 1-5 dk süresince, tercihen 2 dakika süresince beklenir. Sonrasında ışık mikroskop altında tercihen 40X objektif kullanılarak spermier değerlendirilir. Semen numunesi içerisinde bulunan apoptotik sperm hücreleri Annexin V ile bağlandığı için bu spermier lateks boncukla çevrili olarak gözükecektir ve apoptotik sperm hücreleri olarak sınıflandırılacaklardır. Lateks boncuklarla çevrili olmayan sperm hücreleri ise apoptoz görülmeyen sağlıklı sperm olarak sınıflandırılacaklardır. Bu şekilde boncukla çevrili olmayan sağlıklı spermier mikroyenjeksiyon işlemi için seçilebilecektir.

Bu temel kavramlar etrafında, buluş konusu ile ilgili çok çeşitli uygulamaların geliştirilmesi mümkün olup, buluş burada açıklanan örneklerle sınırlandırılmaz, esas olarak istemlerde belirtildiği gibidir.

Teknikte uzman bir kişinin buluşta ortaya konan yeniliği, benzer yapılanmaları kullanarak da ortaya koyabileceği ve/veya bu yapılanmayı ilgili teknikte kullanılan benzer amaçlı diğer alanlara da uygulayabileceği açıktır. Dolayısıyla böyle yapılanmaların yenilik ve özellikle tekniğin bilinen durumunun aşılması kriterinden yoksun olacağı da aşikârdır.