

Pauliina Kukkoaho

ICSI- JA IVF-ALKIOIDEN ANEUPLOIDIAT KROMOSOMITASOLLA

Indikaattoreita laboratorio-olosuhteiden kehittämiseksi?

TIIVISTELMÄ

Pauliina Kukkoaho: ICSI- ja IVF-alkioiden aneuploidiat kromosomitasolla
Kandidaatintutkielma
Tampereen yliopisto
Bioteknologian tutkinto-ohjelma
Huhtikuu 2020

Aneuploidia eli yksittäisen kromosomin lukumäärän muutos on merkittävin yksittäinen syy alkoiden kehittymisen pysähtymiseen ja raskauksien aikaansaamisen epäonnistumiseen hedelmöityshoitojen kontekstissa. Tiedetään, että suurin osa alkoiden aneuploidioista on munasoluperäisiä, ja että aneuploidioiden määrä lisääntyy munasolun ikääntymisen eli naisen iännousun mukana. Hedelmöityshoitojen yhteydessä tavataan kuitenkin varsin korkeita aneuploidia-asteita myös nuorten munasolujen keskuudessa, jolloin aneuploidioiden lähteeksi ei voida välttämättä päätellä puhtaasti munasolun ikään liittyviä tekijöitä. Hedelmöityshoitojen yhteydessä on huomioitava munasolun hedelmöitymisen ja alkion solunjakautumisen sijoittuvan laboratorio-olosuhteisiin, *in vitro*. Tekijät kuten pH, lämpötila, hapettavat olosuhteet, hedelmöitystapa sekä viljelyliuos voivat mahdollisesti vaikuttaa kehittyvän alkion aneuploidioiden syntyyn. Tämän tutkimuksen tarkoituksena on vertailla sekä hedelmöitystapojen että ikäryhmien välisiä eroja alkoiden aneuploidia-asteissa ja aneuploidioiden tyypeissä. Tavoitteena olisi löytää kromosomeja, joiden aneuploidioille ei voida osoittaa selkeää ikäriippuvuussuhdetta. Näiden kromosomien aneuploidia-asteiden tarkkaileminen voisi tukea kokonaisaneuploidia-astetta *in vitro*-olosuhteiden indikaattorina.

Tutkimuksen kohteena oli 384 hedelmöityshoitojen avulla aikaansaatua alkioita. Tutkittavia alkioita saatiin yhteensä neljältä hedelmöityshoitoklinikalta, pääasiallisesti Ovumia Fertinova Oy:n Tampereen klinikalta. Alkiot tutkittiin laajamittaisilla kromosomitutkimuksilla (PGT-A), joista saadut kromosomikohtaiset tiedot kerättiin Excel-taulukkoon. Aneuploidiatuloksia analysoitiin hedelmöitystavan (ICSI vs. IVF), ikäryhmän ja kromosomikohtaisten aneuploidiatulosten perusteella.

Alkioista 351:lle saatiin tutkimuksen kannalta validi tulos kromosomitutkimuksista. Kaikkiaan 71,8% alkioista oli aneuploidisia. Hedelmöitystapojen välillä ei havaittu eroja alkoiden aneuploidisuudessa ($p=0,123$). Kompleksinen aneuploidia (2-4 aneuploidiaa alkiossa) osoittautui vahvasti ikäriippuvaiseksi, mutta kaoottisesti aneuploidisten alkoiden (≥ 5 aneuploidiaa alkiossa) esiintyvyys todettiin enemmän sattumanvaraiseksi. Nuorimman ikäryhmän (≤ 35 vuotta) keskuudessa ICSI-alkiot olivat useammin euploidisia kuin IVF-alkiot ($p=0,015$). Kromosomin 21 aneuploidia-aste erosi eniten hedelmöitystapojen välillä ($p=0,036$). Myös kromosomin 16 ($p=0,097$) aneuploidia-asteen ero hedelmöitystapojen välillä on huomioitava, vaikka se ei ylitä tilastollisen merkitsevyyden raja-arvoa ($p<0,05$). ICSI-alkioilla havaittiin myös kromosomistossa normaalia laajemmalle sijoituvaa segmentaalista aneuploidiaa. Kymmenelle kromosomille havaittiin tilastollisesti merkitsevä ikäriippuvuus. Kromosomit 7, 8 ja 12 osoittautuivat tässä aineistossa heikoimmin ikäriippuvaisiksi, ja niitä voidaan tämän tutkimuksen perusteella pitää parhaina yksittäisinä *in vitro*-olosuhteiden indikaattorikandidaatteina.

Potentiaalisia indikaatioita mahdollisista laboratorioeräisistä aneuploidioista pystyttiin löytämään annetun pienen aineiston pohjalta. Kuitenkin, aineiston pieni koko ja vastaavaa tutkimusta koskevien julkaisujen vähäisyys vaikeuttivat riittävän luotettavaa analyysiä. Nykytietämyksemme munasolujen ja alkoiden aneuploidioista perustuu pitkälti hiirikokeille ja FISH-tekniikalla toteutetuille kromosomitutkimuksille, joista molemmissa on omat sovellettavuusrajoitteensa. Tämän tutkimuksen kaltaista, uudemmillä testimenetelmillä suoritettua tutkimusta tarvittaisiin lisää yleisen ymmärryksen kasvattamiseksi. Laboratoriomenetelmien ja viljelyolosuhteiden optimoinnin kannalta olisi suureksi eduksi, jos tutkimuksella löydettäisiin kromosomeja, joiden aneuploidiaerot korreloivat *in vitro*-olosuhteiden kanssa.

Avainsanat: alkion aneuploidia, ICSI, IVF, hedelmöityshoidot, alkion kromosomitutkimus, PGT-A

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	3
2. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	5
2.1 Potilaat	5
2.2 Munasolujen stimulaatio ja keräys	5
2.3 Hedelmöitys ja alkioden viljely.....	6
2.4 Biopsointi	6
2.5 Alkion kromosomitutkimus (PGT-A)	6
2.6 Tilastollinen analyysi	7
3. TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	7
3.1 Hedelmöitystapakohtaiset tulokset.....	8
3.1.1 Yleisesti	8
3.1.2 Hedelmöitystavan vaikutus kromosomikohtaisiin aneuploidia-asteisiin	10
3.1.3 Hedelmöitystavan vaikutus aneuploidioiden tyyppeihin	12
3.2 Ikäryhmäkohtaiset tulokset.....	14
3.2.1 Yleisesti	14
3.2.2 Iän vaikutus kromosomikohtaisiin aneuploidia-asteisiin.....	14
4. POHDINTA	16
LÄHDELUETTELO	20
LIITE 1: KROMOSOMIKOHTAISET ANEUPLOIDIA-ASTEET IKÄRYHMITTÄIN	22

1. JOHDANTO

Aneuploidiat eli yksittäisten kromosomien lukumäärän poikkeavuudet käsittävät nullisomiat, monosomiat ja trisomiat. Nämä esiintyvät useimmiten koko yksilön solupopulaatiossa, mutta mahdollisesti myös vain osassa yksilön soluista (mosaikismi) tai vain osittaisena kromosomin puutoksena tai lisäyksenä (segmentaalinen aneuploidia). Koko kromosomin aneuploidiat johtuvat usein meioottisten solunjakautumisten aikaisista ongelmista (Chiang ym. 2012, Munné ym. 2017, Stolakis ja Bertero 2019). Mosaikismi on puolestaan peräisin mitoottisista solunjakautumisista (Stolakis ja Bertero 2019), joista myös segmentaalisten aneuploidioiden katsotaan pääosin johtuvan (Babariya ym. 2017). Aneuploidiat ovat merkittävin yksittäinen syy sekä koeputkihedelmöityksen keinoin aloitettujen raskauksien epäonnistumisiin että spontaaneihin raskauden keskeytymisiin (Chiang ym. 2012, Stolakis ja Bertero 2019). Alkion aneuploidisuus johtaa yleensä alkionkehityksen pysähtymiseen tai alkion kohtuun kiinnittymisen epäonnistumiseen (Babariya ym. 2017). Tämä osoittaa luonnollisen, euploidisia alkioita suosivan selektiomekanismin olemassaolon kaikissa alkionkehityksen vaiheissa (Magli ym. 2009). Syntyneiden yksilöiden populaation joukossa aneuploidioiden esiintyvyys on noin 0,3%, kun taas spontaaneissa keskenmenoissa esiintyvyys on jopa 35% (Handyside 2012, Nagaoka ym. 2013). Koeputkihedelmöityksen keinoin aikaansaatuja alkioita aneuploidia-aste vaihtelee jopa 40%:sta yli 80%:iin riippuen tutkimusasettelusta (Handyside 2012, Franasiak ym. 2014A, Franasiak ym. 2014B).

Tiedetään, että suurin osa aneuploidioista ovat munasoluperäisiä (Kuliev ym. 2011) ja että aneuploidioiden todennäköisyys kasvaa merkittävästi naisen iännousun myötä (Chiang ym. 2012, Handyside 2012, Munné ym. 2017, Stolakis ja Bertero 2019). Nämä munasoluperäiset aneuploidiat voivat johtua ensimmäisessä tai toisessa meioottisessa jakautumisessa (MI ja MII) tapahtuvista jakautumisen virheistä (Chiang ym. 2012, Handyside 2012, Stolakis ja Bertero 2019). Munasolun meioottiset jakautumiset sijoittuvat ajallisesti kauas toisistaan; MI pysähtyy profaasiin ennen yksilön syntymää tai välittömästi syntymän jälkeen. MI jatkuu ja etenee MII:een vasta ennen ovulaatiota ja hedelmöityksen tapahtuessa. Jopa vuosikymmeniä kestävä meioosin pysähdysvaiheen aikana kromosomien asianmukaisesta sijoittumisesta vastaavat tekijävaihdunnassa muodostuneet kiasmat sekä kohesiini-proteiinikompleksit. (Handyside 2012)

Munasoluperäisten kromosomaalisten jakautumisten ongelmien alkuperäksi onkin ehdotettu monia tekijöitä, joista kohesiinien ennenaikainen tuhoutuminen tai ajan myötä luonnollisesti hajoaminen on noussut johtavaksi teoriaksi (Chiang 2012, Stolakis ja Bertero 2019). Kohesiinien väheneminen ja ennenaikainen hajoaminen on todistettu hiirimalleilla ja prosessin konservoituneen luonteen myötä sen voidaan uskoa myös koskevan ihmisen munasoluja, vaikka suoraa todistusta ei ole (Chiang ym. 2012, Handyside 2012, Nagaoka ym. 2013). Kohesiinien tuhoutumisen teoria koskee erityisesti MI-

spesifisiä aneuploidioita, joille voidaan siten havaita aneuploidioiden yleisyyden kasvua naisen iän nousun mukana. Koeputkihedelmöitettyjen alkioiden kontekstissa on oleellista huomata, että ensimmäinen meioottinen jakautuminen tapahtuu *in vivo*, mutta toinen meioottinen jakautuminen *in vitro*.

On kuitenkin osoitettu, että myös nuorten, luovutettujen munasolujen avulla toteutetuissa koeputkihedelmöityksen keinoin aikaansaaduissa alkioiden tavataan korkeita aneuploidia-asteita (Sills ym. 2014). Tällaisessa populaatiossa voisi siis mahdollisesti olla aneuploidioita, joiden alkuperä ei liity munasolun ikään. Näin ollen on tarpeellista pohtia myös muita syitä, jotka voivat aikaansaada koeputkihedelmöitettyjen alkioiden korkean aneuploidia-asteen. Esimerkiksi sukusoluperäiset geneettiset tekijät ja hedelmöityshoitoihin liittyvät toimintatavat ja menetelmät voivat osaltaan vaikuttaa aneuploidioiden syntyyn (Magli ym. 2009). Laboratorio-olosuhteiden ja hedelmöityshoitoihin liittyvien toimintatapojen vaikutusta aneuploidioihin on pohdittu paljon. Euploidia-asteet vaihtelevat hedelmöitysklinikoiden välillä suuresti: Munné ym. vuonna 2017 julkaiseman tutkimuksen mukaan vaihtelua on jopa 39.5%:sta 82.5%:iin. Muuttujat kuten pH, lämpötila, laboratorion toimintatavat, hedelmöitystekniikka (IVF tai ICSI) sekä hormonistimulaatio koetaan mahdollisina aneuploidioihin vaikuttavina tekijöinä (Swain 2019). Toimintatavoista erityisesti munasoluja stimuloivien hormonien määrällä on ajateltu olevan vaikutusta alkioiden laatuun ja aneuploidisuuteen (Nagaoka ym. 2013). Kirjallisuudessa esitettyjä aneuploidia-asteita tulkitessa tulee aina ottaa huomioon myös kromosomitutkimuksiin käytetty testimenetelmä, sen resoluutio, käytetyt algoritmit sekä testilaboratorioiden raportointikriteerit. Hedelmöityshoitoihin liittyvien protokollien ja vaikuttavien tekijöiden monimuotoisuuden vuoksi suoria syy-seuraussuhteita voi kuitenkin olla hyvinkin vaikea todeta (Munné ym. 2017, Swain 2019).

Hedelmöitystekniikat luovat jokseenkin erilaiset lähtöasetelmat alkiolle; ICSI:ssä eli mikrohedelmöityksessä hedelmöitys tapahtuu yksittäisen siittiösolun injektoimisella kypsään munasoluun, jonka ympäriltä on poistettu suojaavat kumulussolut. Alkio asetetaan tämän jälkeen viljelyliuokseen. IVF:ssä eli maljahedelmöityksessä munasolu asetetaan suojaavien kumulussolujensa kanssa hedelmöityслиuosalustalle, jolle myös siittiösolut asetetaan. Hedelmöitymisen annetaan tapahtua maljalla hedelmöityслиuoksessa. Tyypillisesti vajaan vuorokauden kuluttua ylimääräiset siittiösolut sekä kumulussolut pestään pois ja hedelmöitynyt munasolu asetetaan viljelyliuokseen. Näin ollen ympäristö on hedelmöitystapojen välillä aluksi erilainen sekä liuosympäristön että munasolun luontaisen suojakerroksen osalta. Tämän lisäksi ICSI:n mahdollisiksi alkioita häiritseviksi tekijöiksi on ehdotettu muun muassa injektioneulan aiheuttamaa fyysistä vauriota ja toisaalta siittiösolujen luonnonvalinnan sivuuttamista aneuploidioita mahdollisesti lisäävänä tekijänä (Sahin ym. 2020). IVF:ssä taas pitkä inkubaatioaika hedelmöityслиuoksessa saa aikaan reaktiivisten happiyhdisteiden muodostumista, jotka voivat osaltaan vaikuttaa alkion varhaisiin kehitysvaiheisiin (Kattera ja Chen 2003). Hedelmöitystapa valitaan hedelmöityshoitoihin hakeutuneen parin sukusoluihin liittyvien indikaatioiden sekä mahdollisten aiempien hoitokertojen tietojen perusteella.

Tämän tutkielman tutkimuskysymykset pohjautuvat ajatukseen siitä, voidaanko laboratorio-olosuhteiden ja -menetelmien avulla vaikuttaa aneuploidia-asteeseen. Tärkeänä motivaationa tutkimukselle toimii Ovumia Fertinova Oy:ssä vuonna 2020 suoritettava viljelyliuoskokeilu. Pyrkimyksenä on löytää tilastollisen analyysin avulla merkkejä sellaisista aneuploidioista, joille ei voida osoittaa vahvaa ikäriippuvuutta tai muuta selkeää lähdettä, jolloin niiden alkuperän voidaan ajatella johtuvan osin esimerkiksi laboratorio-olosuhteista. Tutkimuskysymystä lähestytään kahdesta eri näkökulmasta; Onko ICSI- ja IVF-alkioiden aneuploidioiden tyypeissä ja asteissa eroavaisuuksia? Löydetäänkö yksittäisiä kromosomeja, jotka toimisivat muita kromosomeja parempina indikaattoreina *in vitro*-olosuhteiden vaikutuksen alaisille aneuploidioille? Yksittäiset indikaattorikromosomit ja niiden aneuploidia-asteiden seuraaminen kokonaisaneuploidia-asteen rinnalla voisivat helpottaa optimaalisten kasvatusolosuhteiden määrittelyä ja löytämistä.

2. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

2.1 POTILAAT

Tutkimuksen kohteena oli yhteensä 384 koeputkihedelmöitettyä alkioita 101 hoitokerralta ajanjaksolla 06/2015 – 01/2020. Alkiot olivat pääasiallisesti Ovumia Fertinova Oy:n Tampereen klinikalta (n=336). Tämän lisäksi alkioita oli saatu pakastettuna HUSLAB:ilta (n=2), InOva klinikalta Kuopiosta (n=4) ja Ovumia Fertinova Oy:n Helsingin klinikalta (n=42). Suurin osa alkioista on peräisin potilaan omista munasoluista, ja 35 alkion kohdalla on hyödynnetty munasolunluovuttajia. Iän keskiarvo oli 38,80 vuotta (20 - 46 vuotta). Munasolunluovuttajien iän ylärajaksi on Ovumia Fertinova Oy:ssä määritely 35 vuotta. Iällä viitataan tässä tutkimuksessa äidin tai munasolun luovuttajan ikään munasolujen keräyksen hetkellä, ja tätä kutsutaan jatkossa munasolun iäksi. Aineistossa ikää käsitellään sekä jatkuvana muuttujana että ikäryhmittäin. Ikäryhmittelyssä jaotteluna käytettiin ≤ 35 vuotta, 36-39 vuotta, 40 vuotta, 41 vuotta ja ≥ 42 vuotta. Ikäryhmien jaottelu perusteltiin hedelmöityshoitojen kontekstissa kliinisesti merkittäviksi havaituilla ikäjakoilla, ja toisaalta jaottelun perusteena on myös ryhmäkokojen tasaiseksi saattaminen.

2.2 MUNASOLUJEN STIMULAATIO JA KERÄYS

Munasolujen stimulaatio suoritettiin pääasiassa ns. pitkän agonistikaavan avulla, jossa naisen oma aivolisäkehormonituotanto (FSH ja LH) hiljennetään ennen muun hoidon aloittamista agonistin (GnRH-analogi) avulla. Ihon alle pistettävät gonadotropiinit (FHS ja LH) eli munasarjoja stimuloivat hormonit saavat aikaan munasolujen kypsymisen, jota seurataan ultraäänitutkimusten avulla. Kypsät munasolut punktoidaan onnistuneen hormonihoidon lopuksi hedelmöitettäväksi ja viljeltäväksi. (https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00870) PGT-A:ssa pitkää agonistikaavaa suositaan sen paremman ja varmemman ajoitettavuuden vuoksi.

2.3 HEDELMÖITYS JA ALKIOIDEN VILJELY

Alkioista 52,3% (n=203) hedelmöitettiin mikroinjektiotekniikalla (ICSI), joka suoritettiin PICSI:nä (Physiological ICSI). Loput 46,6% (n=181) hedelmöitettiin maljahedelmöityksellä (IVF). Hedelmöitysluoksena käytettiin Origion Fert-liuosta ja viljelyliuksena Origion yksivaiheista SAGE 1-step-viljelyliuosta. Alkioita viljeltiin kaikkiaan 5-7 päivän ikään eli blastokystivaiheeseen. Muilta klinikoilta Ovumia Fertinova Oy:n Tampereen klinikalle tulleet, pakastetut alkiot (n=48) olivat 2-5 päivän ikäisiä: ne sulatettiin, jatkoviljeltiin ja biopsoitiin Tampereen Ovumia Fertinova Oy:n toimesta. Lähes kaikki alkiot (n=375) viljeltiin embryoskoopissa, eli alkioiden viljelyyn ja seurantaan suunnitellussa inkubaattorissa, joka kuvaa alkioita koko viljelyn ajan.

2.4 BIOPSOINTI

Alkioiden biopsointi eli solujen kerääminen PGT-A-tutkimusta varten suoritettiin kaikkien alkioiden tapauksessa Tampereen Ovumia Fertinova Oy:n toimesta. Biopsointi suoritettiin alkioiden ollessa blastokystivaiheessa, eli 5-7 päivän ikäisiä, painottuen päiviin 5 ja 6. Biopsia otettiin alkion trofoektodermin eli blastokystin ulkosolujen soluista. Kuoriutumattomien alkioiden ketto (zona pellucida) eli munasolua ja alkioita suojaava glykoproteiinikerros avattiin laserpulssin avulla, jotta alkion solujen käsittely oli mahdollista. Alkion trofoektodermin soluja irrotettiin laserpulssien ja biopsointipipetin avulla. Tutkimuksen kohteena oleville alkiolle annettiin keskiarvallisesti 5 (1-10) laserpulssia, joiden avulla biopsoitavat solut saatiin irrotettua alkion ulkosolumassasta. Soluja kerättiin keskimäärin 6,4 (2-15). Biopsionnin jälkeen alkiot pakastettiin vitrifiomalla.

2.5 ALKION KROMOSOMITUTKIMUS (PGT-A)

Tutkimuksessa käytetyt alkiot olivat läpikäyneet alkion kromosomitutkimuksen (PGT-A, Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy) potilaiden toiveesta. Solunäytteet lähetettiin kuriiripalvelun avulla kylmäkuljetuksena alkion kromosomitutkimuksen suorittaville yrityksille. Tutkimuksen kohteena olevia alkioita oli tutkittu tässä tapauksessa neljän eri firman toimesta; Genetyx (n=4), Reprogenetics (n=40), Invicta (n=130) ja Igenomix (n=210). Näissä alkion kromosomitutkimus suoritettiin NGS-menetelmillä (Next Generation Sequencing), joilla saadaan tulos kaikille kromosomille. Kromosomitutkimuksen suorittaneet yritykset raportoivat kromosomikohtaiset aneuploidiatiedot sisältäen sekä koko kromosomin että segmentaaliset aneuploidiat. Mainituista yrityksistä Invicta ei raportoi erikseen mosaiikkeja alkioita, vaan määrittelevät ne euploidisiksi tai aneuploidisiksi mosaikismin asteen mukaan (raja-arvo 50%). Myös kompleksisen aneuploidian raportoinnissa on yritysten välillä eroavaisuuksia; Reprogenetics raportoi jokaisen aneuploidian kromosomikohtaisesti. Invicta puolestaan raportoi kromosomikohtaisen tuloksen vain, mikäli aneuploidioita on alle viidessä kromosomissa yhdessä alkiossa, ja Igenomix raportoi kromosomikohtaisen tuloksen alle kuudelle aneuploidiselle kromosomille alkiossa. Eri raportointistandardien mukaisten tulosten yksiselitteisen

vertailun mahdollistamiseksi tässä työssä 2-4 kromosomin aneuploidiaa kutsutaan kompleksiseksi aneuploidiaksi ja yli neljän kromosomin aneuploidiaa kaoottiseksi aneuploidiaksi.

2.6 TILASTOLLINEN ANALYYSI

Alkioista saaduista tiedoista kerättiin Excel-taulukko Ovumia Fertinova Oy:n Peter Bredbackan toimesta. Taulukko sisältää tietoa mm. alkioiden blastokystivaiheen morfologisista luokituksista, munasolun iästä, biopsointiin liittyvistä toimista ja tuloksista sekä PGT-A tuloksista kromosomikohtaisesti. Alkioita ryhmiteltiin hedelmöitystavan ja munasolun iän mukaan. Kuvaajat muodostettiin Excel-taulukkolaskentaohjelman avulla. Ryhmittelyjen mukaisia aneuploidiatuloksia käsiteltiin IBM SPSS Statistics- ohjelmiston avulla; tilastollinen analyysi suoritettiin Fisherin tarkan t-testin avulla. Ikäryhmien ja hedelmöitystavan eroja vertailtaessa käytettiin ristiintaulukointia. Tarkasteltaessa ikää jatkuvana muuttujana (ei normaalijakauman mukainen), käytettiin epäparametrista Mann-Whitney-U -testiä p-arvon selvittämiseksi. Tilastollisen merkitsevyyden raja-arvona käytettiin $p < 0,05$.

3. TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Tutkimuksen kohteena olevien 384 alkion kromosomitutkimuksen yleiset tulokset on esitetty taulukossa 1. Näistä 384 alkioista PGT-A-tulos oli informatiivinen 96,9%:lle ($n=372$). Kaikkiaan 91,4% alkioista ($n=351$) sai tämän tutkimuksen kannalta validin tuloksen: triploidiset (1,3%, $n=5$) ja mosaiikkiset aneuploidiset (4,2 %, $n=16$) alkioit päätettiin rajata vertailukelpoisten alkioiden ulkopuolelle yksiselitteisten lopputulosten aikaansaamiseksi. Alkioista 6,8% ($n=26$) oli kaoottisesti aneuploidisia. Näistä 14:lle ei ole raportoitu aneuploidioita kromosomikohtaisesti, ja lopuille 12:lle nämä kromosomikohtaiset aneuploidiatiedot ovat saatavilla. Ero johtuu alkion kromosomitutkimuksen suorittaneiden yritysten raportointistandardeista. Raportointistandardien eroavaisuuksista johtuen alkioiden joukkoa jouduttiin rajaamaan vielä yksittäisiin tulosten tarkasteluihin. Myös sukupuolikromosomien tulos jätettiin tulosten yksiselitteisyyden vuoksi kromosomikohtaisten tarkastelujen ulkopuolelle. Alkion kromosomitutkimuksia suorittavien yritysten toimesta ilmoitettava monosomiatulos X0 ei kerro, onko kyseessä puuttuva X vai Y kromosomi, joka tekee kromosomikohtaisen analyysin näiden osalta mahdottomaksi.

Tämän tutkimuksen kannalta vertailukelpoisen tuloksen saaneiden alkioiden yhdistetty aneuploidia-aste on 71,8% (taulukko 2). Aneuploidia-asteet voivat vaihdella suuresti klinikoiden välillä (Munné ym. 2017, Swain 2019). 71,8% on muihin kirjallisuudessa todettuihin aneuploidia-asteisiin nähden verraten korkea; aneuploidisia alkioita on havaittu aiemmissä tutkimuksissa hyvinkin vaihtelevia määriä tutkimusasettelusta riippuen. Esimerkiksi Franasiak ym. (2014A) esittävät laajamittaisen, kaikki kromosomit kattavan, alkioiden trofoektodermin solunäytteille suoritetun tutkimuksen perusteella aneuploidia-asteen olevan 40,7%. Toisaalta Sills ym. (2014) tutkivat nuorten (20-29 vuotta)

munasolun luovuttajien vaikutusta alkioiden aneuploidia-asteeseen: alkioista 53,2% todettiin aneuploidisiksi. Tutkittaessa miehen hedelmättömyyden osuutta aneuploidioihin, aneuploidia-aste vaihtelee 62-69%:n välillä riippuen hedelmättömyyden syystä (Magli ym. 2009). Kirjallisuudessa on kuitenkin myös tavattu jopa 85%:n aneuploidia-asteita (Franasiak ym. 2014B). Kirjallisuudessa todetut aneuploidia-arvot eivät kuitenkaan ole suoraan toisiinsa verrattavissa, sillä muun muassa kromosomitutkimuksen suorittamiseen käytetty menetelmä ja erot potilaiden ikäjakaumassa voivat vaikuttaa merkittävästikin raportoituun aneuploidia-asteeseen.

Taulukko 1: Alkion kromosomitutkimuksen (PGT-A) tulokset hedelmöitystavan mukaan jaoteltuna.

	ICSI (n)	ICSI (%)	IVF (n)	IVF (%)	YHT. (n)	YHT. (%)
KOKONAISMÄÄRÄ	181	100,0 %	203	100,0 %	384	100,0 %
EUPLOIDINEN	53	29,3 %	46	22,7 %	99	25,8 %
KOKO KROMOSOMIN ANEUPLOIDIA	92	50,8 %	123	60,6 %	215	56,0 %
SEGMENTAALINEN ANEUPLOIDIA	5	2,8 %	6	3,0 %	11	2,9 %
KAOOTTINEN ANEUPLOIDIA	14	7,7 %	12	5,9 %	26	6,8 %
EI PGT-A-TULOSTA	7	3,9 %	5	2,5 %	12	3,1 %
TRIPLOIDINEN	5	2,8 %	0	0,0 %	5	1,3 %
MOSAIIKKI	4	2,2 %	6	3,0 %	10	2,6 %
SEGMENTAALINEN MOSAIIKKI	1	0,6 %	5	2,5 %	6	1,6 %

Taulukko 2: Tämän tutkimuksen kannalta vertailukelpoisen kromosomitutkimuksen tuloksen saaneiden alkioiden kokonaismäärät sekä suhteelliset osuudet vertailukelpoisista alkioista.

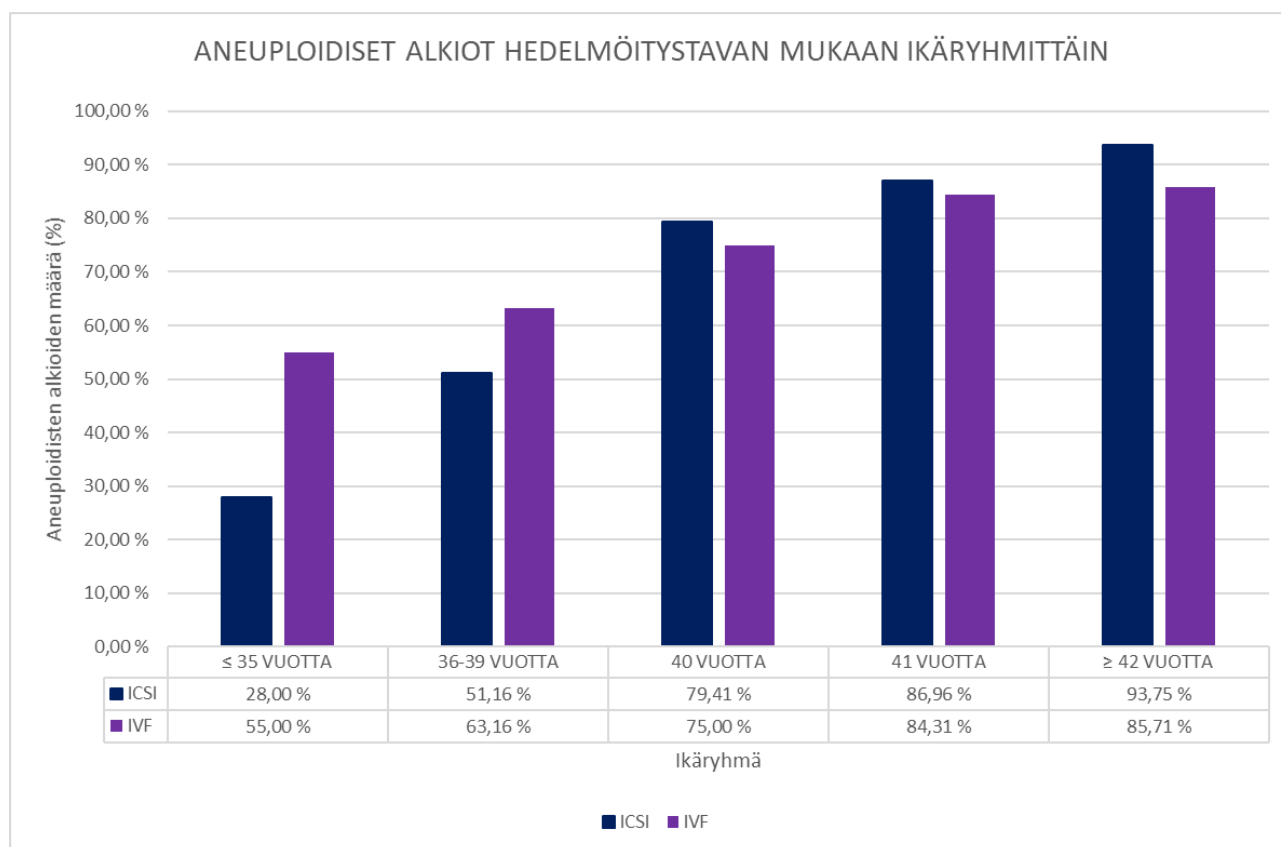
	ICSI (n)	%	IVF (n)	%	YHT. (n)	%
YHTEENSÄ	164	100,0 %	187	100,0 %	351	100,0 %
EUPLOIDISET	53	32,3 %	46	24,6 %	99	28,2 %
KOKONAAN ANEUPLOIDINEN	92	56,1 %	123	65,8 %	215	61,3 %
SEGMENTAALINEN ANEUPLOIDIA	5	3,0 %	6	3,2 %	11	3,1 %
KAOOTTINEN ANEUPLOIDIA	14	8,5 %	12	6,4 %	26	7,4 %
YHTEENSÄ ANEUPLOIDISET	111	67,7 %	141	75,4 %	252	71,8 %

3.1 HEDELMÖITYSTAPAKOHTAISET TULOKSET

3.1.1 YLEISESTI

Tässä laskukelpoisiksi alkioiksi lasketaan aneuploidiset, euploidiset, segmentaalisesti aneuploidiset sekä kaoottisesti aneuploidiset alkiot (n=351). Taulukon 2 mukaisesti näistä 164 on ICSI-alkioita ja 187 on IVF-alkioita.

ICSI-alkioiden yhdistetty aneuploidia-aste on taulukon 2 mukaisesti 67,7% ja IVF-alkioiden 75,4% ($p=0,123$). Sahin ym. (2020) ovat saaneet tutkimuksessaan pitkälti samankaltaisia tuloksia: IVF-alkioiden aneuploidia-aste oli 65% ja ICSI-alkioiden 69,9%. Kuitenkin pienen otosmäärän ($n=240$) tutkimus (Sahin ym. 2020) osoittaisi ICSI-alkioiden olevan IVF-alkioita suuremmalla todennäköisyydellä aneuploidisia, vastoin tämän tutkimuksen tuloksia. Erot eivät kuitenkaan ole kummassakaan tutkimuksessa tilastollisesti merkitseviä ja voivat siten johtua sattumasta. Tämän tuloksen valossa voidaan päätellä, että yleisesti hedelmöitystavalla ei ole vaikutusta aneuploidisuuden todennäköisyyteen. Aiemmassa tutkimuksessa on päädytty samankaltaisiin lopputuloksiin (Palmerola ym. 2019, Sahin ym. 2020), vaikka myös aneuploidia-asteiden eroja hedelmöitystapojen välillä on saatu esille joissakin tutkimuksissa (Sahin ym. 2020). Vaikka nuorimmalla ikäryhmällä (≤ 35 vuotta) IVF-alkioiden aneuploidisuus on prosentuaalisesti huomattavasti korkeampi kuin ICSI-alkioilla (kuva 1), ero näidenkään ryhmien välillä ei kuitenkaan ole tilastollisesti merkitsevää ($p=0,125$). Prosentuaalisten asteiden suuri eroavaisuus voi selittyä nuorimman ryhmän pienellä koolla ($n=45$). Kuvasta 1 nähdään selkeästi aneuploidian todennäköisyyden kasvu nousevan iän mukana sekä ICSI- että IVF-alkioiden tapauksissa.



Kuva 1: Aneuploidisten alkoiden suhteelliset määrät ikäryhmittäin hedelmöitystavan mukaan

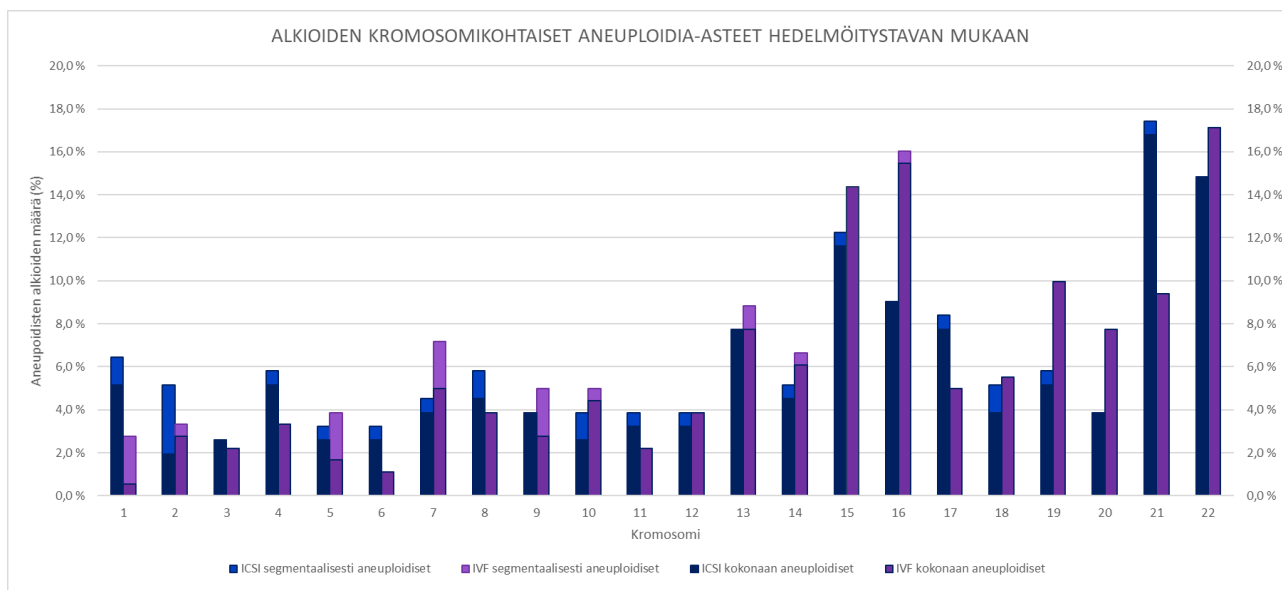
3.1.2 HEDELMÖITYSTAVAN VAIKUTUS KROMOSOMIKOHTAISIIIN ANEUPLOIDIA-ASTEISIIN

Tässä laskukelpoisiksi alkioiksi on laskettu euploidiset, aneuploidiset, segmentaalisesti aneuploidiset ja ne kaoottisesti aneuploidiset alkiot, joille on raportoitu kromosomikohtaiset aneuploidiatulokset (n=337). Alkuperäisen jaottelun ulkopuolelle on siis tässä jätetty ne kaoottisesti aneuploidiset alkiot, joista ei ole toimitettu kromosomikohtaisia aneuploidiatuloksia (n=14).

ICSI-alkioiden useimmin aneuploidiset kromosomit ovat tässä tutkimuksessa 21 (17,4%), 22 (14,8%) ja 15 (12,3%). IVF-alkioilla taas kromosomit 22 (17,1%), 16 (16,0%) ja 15 (14,4%) ovat eniten aneuploidisia. Kromosomikohtaiset tulokset on esitetty kuvassa 2. Kaikki neljä edellä mainittua kromosomia ovat tunnetusti aneuploidisimpien kromosomien joukossa (Franasiak ym. 2014A, Sahin ym. 2020). Toisaalta, esimerkiksi Sills ym. (2014) ovat todenneet kromosomin 15 olevan tutkimuksensa mukaan kaikista harvinaisin aneuploidinen kromosomi. Tutkimuskohtaista vaihtelua esiintyy siis myös kromosomikohtaisten tulosten osalta.

Yleisesti kirjallisuudessa tavataan ristiriitaisia tutkimustuloksia liittyen IVF:n ja ICSI:n käytön hyödyllisyyteen: osa tutkimuksista toteaa ICSI:n tuottavan huomattavissa määrin enemmän aneuploidisia alkioita, toisaalta osa tutkimuksista toteaa, ettei näiden hedelmöitystapojen välillä ole merkittäviä eroja aneuploidia-asteissa. Tämän tutkimuksen tulos tukee jälkimmäistä väitettä IVF:n ja ICSI:n taseisista aneuploidia-asteista.

Yleisimpien aneuploidisten kromosomien kohdalla voidaan havaita eroja aneuploidia-asteissa hedelmöitystapojen välillä. Kromosomi 21 on ICSI-alkioista 17,4%:lla aneuploidinen, kun taas IVF-alkioiden keskuudessa vastaava luku on vain 9,4% ($p=0,036$). Kromosomi 16 taas on IVF-alkioilla 16,0%:lla aneuploidinen, ICSI-alkioilla vain 9,0%:lla ($p=0,097$). Erikoista onkin, että ICSI-alkioiden keskuudessa aneuploidisin kromosomi 21 ja IVF-alkioiden keskuudessa toiseksi aneuploidisin kromosomi 16 ovat ne, joissa on kaikista eniten eroavaisuuksia ryhmien välillä. Näiden tulosten perusteella tulee pohtia mahdollisuutta sille, voiko ICSI hedelmöitystekniikkana mahdollisesti altistaa alkion kromosomin 21 aneuploidialle. Kirjallisuudesta ei löydy tätä tukevia aiempia tutkimustuloksia. On kuitenkin huomioitava, että molemmat näistä kromosomeista kuuluvat tunnetusti aneuploidisimpien kromosomien joukkoon. Tässä tutkimuksessa aineiston pieni koko vaikuttaa aneuploidiahavaintojen määrään ja siten myös erojen p-arvoihin hedelmöitystapojen välillä. Tilastollisesti merkitseviä eroja havaittiin vain kromosomin 21 kohdalla, mahdollisesti sen aneuploidioiden yleisyyden vuoksi. Suuremmalla aineistolla voitaisiin saada tilastollisesti merkitsevempiä eroja kromosomikohtaisissa tuloksissa ja siten aneuploidiaerojen alkuperää voitaisiin tutkia luotettavammin.



Kuva 2: Kromosomikohtaiset aneuploidia-asteet hedelmöitystavan mukaan jaoteltuna. ICSI-alkioiden tulokset on esitetty sinisillä pylväillä, IVF-alkioiden tulokset on esitetty violeteilla pylväillä. Segmentaalisten aneuploidioiden määrät kuvattu vaaleammilla pylväillä kokonaan aneuploidisten pylvään yläpuolella.

Alkioista 8,9 % (30/337) on segmentaalisesti aneuploidisia. Nämä 30 alkioita kantavat yhteensä 38 segmentaalisesti aneuploidista kromosomia. 7,4% kaikista alkioista (n=25/337) kantaa yksittäistä segmentaalisesti aneuploidista kromosomia, loput (n=5) segmentaalisesti aneuploidista alkioita kantavat useaa segmentaalisesti aneuploidista kromosomia. ICSI-alkioista 9,6%:lla (n=15/156) on segmentaalisesti aneuploidinen kromosomi tai kromosomeja, vastaava luku IVF-alkioille on 8,3% (n=15/181). Ero ei ole tilastollisesti merkitsevää (p=0,7045) ja siten voidaan olettaa, että hedelmöitystavalla ei ole tässä aineistossa vaikutusta segmentaalisten aneuploidioiden syntyyn.

Edellä esitetty segmentaalisten aneuploidioiden yleisyys vastaa aiemman tutkimustyön tuloksia; Escribà ym. (2019) esittävät tutkimuksessaan blastokystivaiheen alkioiden (n=3565) segmentaalisen aneuploidian asteeksi 8,4%. Myös korkeampia segmentaalisen aneuploidian asteita on tavattu: Rabinowitz ym. (2012) totesivat segmentaalisen aneuploidian asteeksi 15,3% ja Babariya ym. (2017) vastaavasti 15,6%.

Tämän tutkimuksen alkioiden keskuudessa segmentaalisesti aneuploidinen kromosomi esiintyy useimmiten yhdessä kokonaan aneuploidisen kromosomin kanssa (4,7%, n=16/337). Tulos noudattaa aiemmin kirjallisuudessa todettuja segmentaalisten aneuploidioiden esiintyvyyden malleja (Rabinowitz ym. 2012, Babariya ym. 2017). Vain yksittäistä segmentaalisesti aneuploidista kromosomia kantava alkio (SSA, Single Segmental Aneuploidy) on segmentaalisten aneuploidioiden seuraavaksi yleisin luokka 2,7%:lla (n=9/337). Myös Rabinowitz ym. (2012) toteavat SSA-asteeksi omassa tutkimuksessaan 2,6% kaikista alkioista. On kuitenkin myös tutkimuksia, joissa SSA on yleisin segmentaalisen aneuploidian muoto (Escribà ym. 2019). Segmentaalisten aneuploidioiden esiintyvyydessä voidaan siis nähdä tutkimusasettelusta ja olosuhteista johtuvia eroavaisuuksia eri lähteiden välillä.

Kuten kuvasta 2 voidaan hahmottaa, suurin osa IVF-alkioiden segmentaalista aneuploidioista (87,5%, n=14/16) keskittyy kromosomeihin 1-12, kun taas ICSI-alkioilla vastaava luku on 68,2% (n=15/22). IVF-alkioiden osalta tulos tukee aiempia tutkimustuloksia; 88,1% SSA-alkioista kantaa virhettä kromosomeissa 1-12 (Escribà ym. 2019). Myös Babariya ym. (2017) osoittivat tutkimuksessaan blastokystivaiheen alkoiden segmentaalisten aneuploidioiden keskittyvän aikaisempia kehitysvaiheita enemmän kromosomeihin 1-12. Kromosomit 1-12 ovat kooltaan suuria tai keskikokoisia ja rakenteeltaan metasentrisiä tai submetasentrisiä. Ihmisen kromosomiston muut kromosomit ovat näihin verraten pienempiä ja pääosin submetasentrisiä tai akrosentrisiä. Kromosomien 1-12 rakennepiirteiden voidaan odottaa vaikuttavan kromosomien alttiuteen segmentoitua. (Escribà ym. 2019) IVF-alkioiden segmentaaliset aneuploidiat ovat vahvemmin keskittyneet tiettyihin, kromosomiston alkupään kromosomeihin, ja siten niiden esiintyminen noudattaa ennalta tunnettua trendiä (Babariya ym. 2017, Escrivà ym. 2019). ICSI-alkioiden kromosomien segmentoituminen on kuitenkin levittäytynyt laajemmin koko kromosomiston alueelle: 31,8% (n=7/22) sijoittuu muualle kuin kromosomeihin 1-12. Ero hedelmöitystapojen ja segmentaalisten aneuploidioiden sijoittumisen kromosomeihin 1-12 verraten kromosomeihin 13-22 suhteen ei kuitenkaan ole tilastollisesti merkitsevä ($p = 0.2537$). Monet tutkimukset ovat osoittaneet, että segmentaalinen aneuploidia on lähtöisin enemmän mitotoottisista kuin meioottisista jakautumisista toisin kuin koko kromosomin aneuploidiat (Babariya ym. 2017, Escrivà ym. 2019). On myös todettu, että segmentaalisten aneuploidioiden todennäköisyys ei täten nouse munasolun iän kasvun mukana (Rabinowitz ym. 2012, Babariya ym. 2017, Escrivà ym. 2019). Hedelmöityshoitojen kontekstissa on oleellista huomata, että kaikki alkion mitotoottiset solunjakautumiset tapahtuvat *in vitro*-olosuhteissa. Vaikka tilastollista merkitsevyyttä ei tässä aineistossa havaittu segmentaalisten aneuploidioiden sijoittumisen suhteen hedelmöitystapojen välillä, voidaan tätä harkita *in vitro*-olosuhteiden indikaattoreiksi. Lisääntynyt alueellinen segmentaalinen aneuploidisuus ICSI-alkioiden keskuudessa voisi mahdollisesti johtua mitotoottisten jakautumisten aikaisista häiriötekijöistä, jotka voivat solunsisäisten tekijöiden lisäksi olla solunulkoisia, olosuhteisiin liittyviä tekijöitä, mahdollisesti ICSI hedelmöitystekniikkana. ICSI-alkioiden segmentaaliset aneuploidiat ovat kuitenkin kromosomikohtaisesti hyvin yksittäisiä, ja voivat johtua tämän aineiston perusteella myös sattumasta.

3.1.3 HEDELMÖITYSTAVAN VAIKUTUS ANEUPLOIDIOIDEN TYPPEIHIN

Tässä laskukelpoisia ovat aneuploidiset, euploidiset, segmentaalisesti aneuploidiset sekä kaikki kaoottisesti aneuploidiset alkiot (n=351). Aneuploidioiden määrien jaottelu perusteltiin kromosomitutkimuksen suorittaneiden yritysten raportointieroihin: kaikki yritykset raportoivat ainakin neljälle samassa alkiossa esiintyvälle aneuploidiselle kromosomille aneuploidiatuloksen, jolloin raja kompleksisen ja kaoottisen aneuploidian välille tehtiin tämän mukaan. Aneuploidioiden määräryhmät ovat

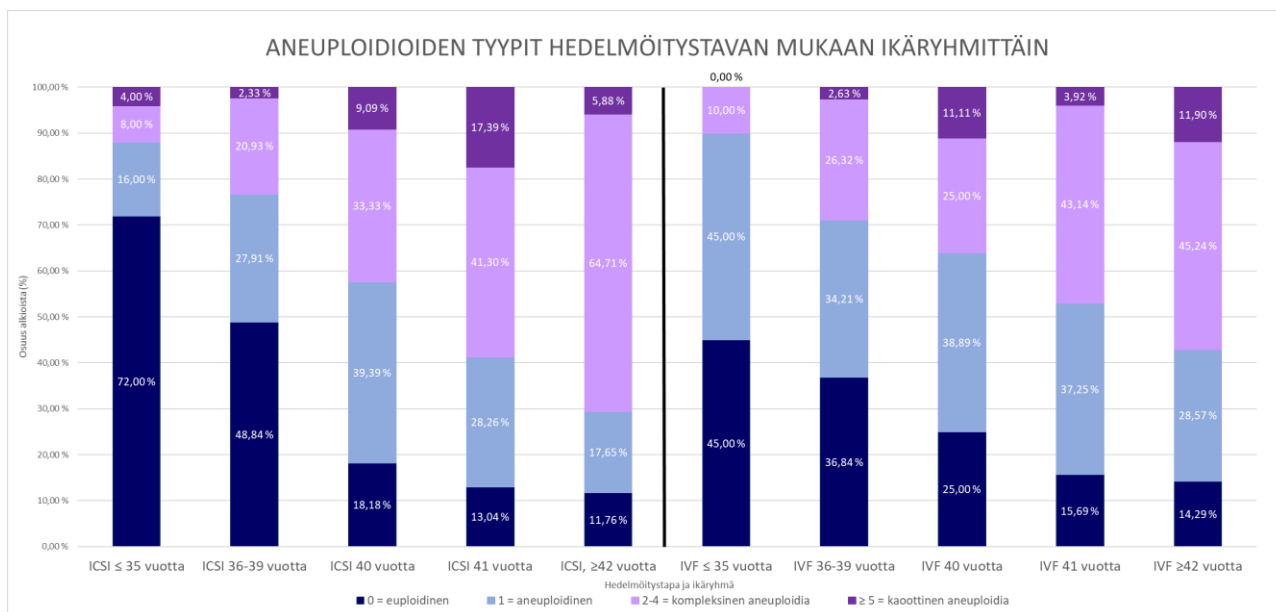
siis 0 aneuploidiaa = euploidinen, 1 aneuploidia = aneuploidinen, 2-4 aneuploidiaa = kompleksinen aneuploidia ja ≥ 5 aneuploidiaa = kaottinen aneuploidia.

Trendi on molemmilla hedelmöitystavoilla samankaltainen: euploidian mahdollisuus laskee jyrkästi iännousun kanssa niin, että euploidisia alkioita on eniten ≤ 35 -vuotiaiden keskuudessa ja vähiten ≥ 42 -vuotiaiden keskuudessa. Vastaavasti aneuploidisuuden todennäköisyys kasvaa sekä yleisesti että sen kompleksisuuden osalta merkittävästi iän mukana. Hedelmöitystapakohtaiset tulokset on esitetty kuvassa 3. Yleisesti ero hedelmöitystapojen ja aneuploidiodien määrän välillä ei ole tilastollisesti merkitsevä ($p=0,109$).

Ikäryhmittäin vertailtaessa ainoastaan alle 35-vuotiaiden ryhmässä erot aneuploidiodien määrässä hedelmöitystapojen välillä ovat tilastollisesti merkitsevät ($p=0,015$). Tässä ikäryhmässä ICSI-alkiot ovat huomattavasti useammin euploidisia (72% vs. 45%) kuin IVF-alkiot. Yhden kromosomin aneuploidioille ei voida suoraan kuvan 3 perusteella päätellä ikäriippuvuutta, vaan yleisyys vaikuttaa jokseenkin tasaiselta läpi ikäryhmien. Suhteelliset osuudet ovatkin ikäryhmien kesken kaikista tasaisimmat yhden aneuploidian kohdalla molemmilla hedelmöitystavoilla. On kuitenkin huomioitava, että nuorimmilla ikäryhmillä euploidiset alkiot vievät suurilla osuuksillaan enemmistön alkiodien aneuploidiodien jakaumasta. Tilanne on päinvastainen vanhimmilla ikäryhmillä, joissa suurin osuus kuuluu kompleksisesti aneuploidisille alkiolle.

2-4 kromosomin kompleksiset aneuploidiat ovat selkeässä trendissä nousevan iän kanssa, jossa riski suurimmillaan kuusinkertaistuu ikäryhmissä edetessä (ICSI: 8% \rightarrow 64,7%). Tämä on kirjallisuudessa ennalta tunnettu vaikutus, vaikka kompleksisten aneuploidiodien ikäriippuvuuden syy ei ole täysin selvillä (Franasiak ym. 2014B). Mahdolliseksi selityksiksi on ehdotettu hupenevia hyvien munasolujen varastoja ikääntyvillä naisilla (Handyside 2012) ja mahdollisesti korostunut alttius aneuploidiodien kehittämislle tai vaihtoehtoisesti alentunut virheiden korjauskapasiteetti (Franasiak ym. 2014B). Munasolun vanhetessa korjausmekanismien toiminnallisuus voi heiketä ja esimerkiksi kohesiinien tuhoutuminen voi vaikuttaa enenevässä määrin, joka voi osaltaan selittää yleistyvän monien kromosomien yhtäaikaisen aneuploidisuuden vanhemmilla ikäryhmillä. Trendi on samankaltainen molemmilla hedelmöitystekniikoilla, vaikkakin prosentuaalinen nousu on ICSI-alkioilla jyrkempää.

Kaottisen aneuploidisuuden (≥ 5 aneuploidista kromosomia) mahdollisuus on enemmän sattumanvaraista ja koskee yksittäisiä alkioita läpi ikäskalan. Prosentuaaliset osuudet kaottisten aneuploidiodien suhteen vaihtelevat ryhmien välillä siten, ettei niille voida todeta nousevan iän mukaista trendiä. Ainoastaan ICSI-alkiodien 41-vuotiaiden ryhmässä kaottisesti aneuploidisia alkioita tavataan korostetun paljon. Muissa ryhmissä kaottisesti aneuploidisten alkiodien määrät ovat niin pieniä, että niiden voidaan ajatella johtuvan esimerkiksi sukusoluperäisistä tekijöistä, kuten yksittäisen munasolun heikosta laadusta (Handyside 2012), tai sattumasta, jotka vaikuttavat siten koko alkioon. Näiden voidaankin olettaa olevan jokseenkin väistämättömiä, eikä kaottisesti aneuploidisiin alkioihin luultavasti voida juurikaan vaikuttaa laboratorio-olosuhteilla.



Kuva 3: Aneuploidioiden tyypit hedelmöitystavan mukaan ikäryhmittäin jaoteltuna. Kuvaajan vasemmalla puolella kuvattu ICSI-alkiot ikäryhmittäin ja oikealla puolella IVF-alkiot ikäryhmittäin

3.2 IKÄRYHMÄKOHTAISET TULOKSET

3.2.1 YLEISESTI

Tässä laskukelpoisiksi alkioiksi lasketaan aneuploidiset, euploidiset, segmentaalisesti aneuploidiset sekä kaottisesti aneuploidiset alkiot (n=351).

Yhdistetyt aneuploidia-asteet ikäryhmittäin ovat 40,0% (≤35 vuotta, n=45), 56,8% (36-39 vuotta, n=81), 78,3% (40 vuotta, n=69), 85,6% (41 vuotta, n=97) ja 86,4% (≥42 vuotta, n=59). Kuten oli odotettavissa, aneuploidioiden riski nousee huomattavasti äidin iännousun mukaan (Handyside 2012, Nagaoka ym. 2013, Franasiak ym. 2014B, Stolakis ja Bertero 2019). Tämän tutkimuksen mukaan aneuploidisten alkioiden määrä enemmän kuin kaksinkertaistuu siirryttäessä alle 35-vuotiaista yli 42-vuotiaisiin. Samankaltaisia tuloksia on esitellyt esimerkiksi Franasiak ym. (2014B) omassa laajamittaisessa tutkimuksessaan: aneuploidia-aste vastaavilla ikäryhmillä kohosi noin 30 %:sta 80%:iin.

3.2.2 IÄN VAIKUTUS KROMOSOMIKOHTAISIIIN ANEUPLOIDIA-ASTEISIIN

Tässä laskukelpoisiksi alkioiksi on laskettu euploidiset, aneuploidiset, segmentaalisesti aneuploidiset ja ne kaottisesti aneuploidiset alkiot, joille on raportoitu kromosomikohtainen aneuploidia data (n=337). Alkuperäisen jaotellun ulkopuolelle on tässä siis jätetty myös ne kaottisesti aneuploidiset

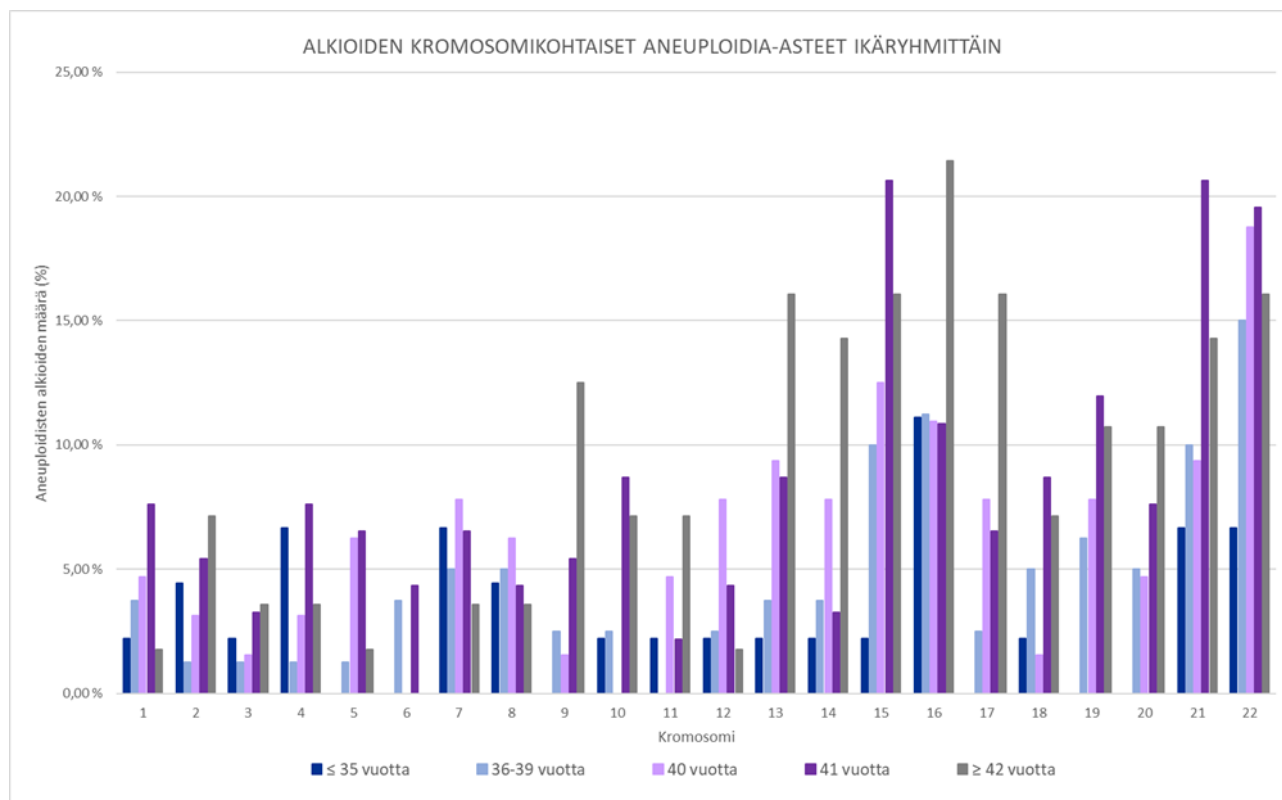
alkiot, joista ei ole toimitettu kromosomikohtaista aneuploidia dataa (n=14). Segmentaalisesti aneuploidiset kromosomit on sisällytetty kromosomikohtaisten aneuploidioiden kokonaismääriin.

Tarkasteltaessa ikää jatkuvana muuttujana ryhmiin jaottelun sijaan, erot aneuploidisuudessa ovat tilastollisesti merkitseviä kromosomien 9 (p=0,001), 10 (p=0,025), 11 (p=0,023), 13 (p=0,015), 14 (p=0,017), 15 (p=0,009), 17 (p=0,0002), 19 (p=0,017), 20 (p=0,017) ja 21 (p=0,039) kohdalla. Kaikkien kromosomien p-arvot esitetty liitteen 1 taulukossa 1. Näiden tietojen pohjalta voitaisiin olettaa näiden kromosomien aneuploidisuuden mahdollisuuden riippuvan korostetusti munasolun iästä, eivätkä nämä kromosomit ole tämän tutkimusasettelun pohjalta kovinkaan vahvoja kandidaatteja *in vitro*-olosuhteiden indikaattorikromosomeiksi. Onkin yleisesti katsottu, että ainakin kromosomien 13 ja 21 aneuploidiat ovat pitkälti MI-spesifisiä (Chiang ym. 2012, Kuliev ym. 2011) ja siten niiden yleisyys nousee vahvasti munasolun iän mukana. Franasiak ym. (2014A) ovat osoittaneet tutkimuksellaan kromosomien 13 ja 21 lisäksi myös kromosomien 15, 16, ja 19 aneuploidisuuden ikäriippuvaisuutta. Kirjallisuudessa tavataan kuitenkin ristiriitaisuutta siitä, ovatko esimerkiksi usein aneuploidiset kromosomit 16, 18 ja 22 MI vai MII-spesifisiä, ja voidaanko niiden siten päätellä johtuvan pääasiassa nousevan iän mukanaan tuomista ongelmista (Handyside 2012, Kuliev ym. 2011, Chiang ym. 2012, Franasiak ym. 2014A). Tämän tutkimuksen perusteella näiden kiistanalaisten kromosomien 16, 18 ja 22 aneuploidiat saattavat olla vähemmän iästä riippuvia ja mahdollisesti enemmän MII kuin MI spesifisiä.

Tämän aineiston pohjalta kaikkien muiden kromosomien aneuploidiaerot ikäryhmien välillä ovat mahdollisesti vähemmän iästä riippuvaisia. Nämä voivat siis saada alkunsa esimerkiksi sattumasta, solunsisäistä tai solunulkoisista tekijöistä. Näiden kromosomien aneuploidioihin voitaisiin siis mahdollisesti vaikuttaa olosuhteiden muutoksilla ja muilla ulkoisilla tekijöillä. Epätasaiset aneuploidiahavaintojen määrät eri kromosomien välillä voivat kuitenkin osaltaan vaikuttaa tulokseen. Lähtökohtaisesti, mitä enemmän aneuploidiahavaintoja on läpi ikäryhmien ja mitä suurempi p-arvo kromosomilla on, sitä heikommin kyseisen kromosomin ikäriippuvuutta voidaan tämän aineiston pohjalta todeta. Kromosomit 6 (p=0,901), 7 (p=0,816), 8 (p=0,786) ja 12 (p=0,93) vaikuttavat p-arvoiltaan sopivimmilta kandidaateilta mahdollisimman ikäriippumattomien indikaattorikromosomien joukkoon. Kromosomi 6 voidaan kuitenkin sulkea pois luotettavan analyysin piiristä, sillä se on hyvin harvinainen aneuploidia ja aneuploidisten kokonaismäärät kromosomin kuusi kohdalla ovatkin hyvin pieniä (kuva 4, liite 1: taulukko 1). Kromosomin 12 aneuploidia-asteet eivät näytä yhtä tasaista jakautumista ikäryhmien välille kuin kromosomit 7 ja 8 (kuva 4). Kuvasta 4 nähdään myös, että jälkimmäiset kromosomit ovat kromosomiston alkupään kromosomien keskuudessa erityisiä juurikin tasaisen, jokseenkin korkeahkon aneuploidia-asteensa vuoksi.

Tässä tutkimuksessa esiintyy eniten aneuploidioita kromosomiluokitusryhmässä G eli kromosomeissa 21 ja 22 (20,42% kaikista aneuploidioista). Tätä seuraavat ryhmät C (20,00%), D (19,17%) ja E (17,29%). Ikäryhmien välillä ei ole merkittäviä eroja aneuploidioiden suhteellisessa sijoittumi-

sessä kromosomistoon. On todettu, että vastoin kuin segmentaalisisä aneuploidioissa, koko kromosomin aneuploidiat ovat yleisempiä kromosomiston loppupään pienempien, submetasentristen ja akrosentristen kromosomien kohdalla (Handyside 2012, Franasiak ym. 2014A). Ryhmä C eli kromosomit 6-12 ovat tässä toiseksi eniten aneuploidioita kantava ryhmä. Sekä ryhmän C korostuneisuus, että ryhmien A ja B suhteellisen suuret osuudet (7,71% ja 5,63%) ovat odottamaton tulos aiempaan kirjallisuuteen verraten (Franasiak ym. 2014A).



Kuva 4: Kromosomikohtaiset aneuploidia-asteet ikäryhmittäin. Aneuploidia-asteisiin on sisällytetty sekä kokonaan että segmentaalisesti aneuploidiset kromosomit. Pylvään puuttuminen tarkoittaa, että kyseisellä ikäryhmällä ei kyseisen kromosomin kohdalla havaittu ainuttakaan kokonaan tai segmentaalisesti aneuploidista tapausta.

4. POHDINTA

Suoritettu tutkimustyö tuo kallisarvoista tietoa tämän aineiston alkioiden aneuploidioista ja niiden mahdollisista alkuperistä. Vastaavaa tutkimusta käsittelevää kirjallisuutta löytyy melko vähän. Suureen osaan olemassa olevasta alkioiden aneuploidioihin liittyvästä tutkimuksesta liittyy vahvasti kaksi sovellettavuusrajoitetta; Suuri osa kirjallisuudessa esitetystä aneuploidiatutkimuksesta on suoritettu FISH-tekniikalla (Fluorescent In Situ Hybridization). Tällä tekniikalla voidaan tutkia vain muutamia kromosomeja kerrallaan. Näiden tutkimusten tulokset eivät luo luotettavaa kuvaa todellisista aneuploidia-asteista: muutamaa tunnetusti usein aneuploidista kromosomia tutkittaessa

aneuploidia-asteet eivät tarjoa kokonaiskuvaa alkion aneuploidioista (Rabinowitz ym. 2012, Nagaoka ym. 2013). FISH-menetelmällä saatuja tuloksia tulee verrata muilla tekniikoilla suoritettuihin tuloksiin vain varoen. Toisaalta ihmisalkioilla tutkimisen etiikka luo vahvasti rajoituksia laajamittaisten alkiotutkimusten suorittamiseen, jonka vuoksi munasolujen ja alkioiden aneuploidiatutkimuksia on suoritettu paljon hiirikokeilla (Handyside 2012). Hiiren lyhyen eliniän ja erilaisen kromosomiston rakenteen takia myös hiirikokeilla saatuja tuloksia tulee soveltaa ihmisiin vain varoen (Chiang ym. 2012, Handyside 2012, Nagaoka ym. 2013). Näiden tutkimusten tuloksille rakentuu kuitenkin vahvasti nykyäsitkemme ikäriippuisten aneuploidioiden mekanismeista. Yllä mainittujen eettisten tekijöiden takia tällaista tutkimusta voidaan suorittaa ihmisalkioilla ainoastaan hedelmöityshoitojen yhteydessä aikaansaatuja, kromosomitestattujen alkioiden avulla.

FISH-tekniikan tilalle on kehitetty muita, monipuolisempia ja laaja-alaisempia kromosomiseulontaan sopivia tekniikoita. Vertaileva geenihybridisaatio (CGH, Comparative Genomic Hybridization), SNP-mikrosirut ja NGS-menetelmät kykenevät kattavaan genomien ja kromosomiston analysointiin ja antavat siten todennäköisempiä tuloksia aneuploidioista. NGS-menetelmien korkeamman resoluution avulla aneuploidiat saadaan esille parhaiten (Palmerola ym. 2019), jonka vuoksi myös aneuploidia-asteet voivat olla aiemmasta tutkimuksesta poikkeavan korkeita. On kuitenkin huomioitava, että myös saman tekniikan sisällä voidaan tavata vaihtelua muun muassa käytetyissä algoritmeissa ja raportointistandardeissa, jotka osaltaan voi vaikuttaa tuloksiin tutkimuskohtaisesti.

Tämä tutkimus edustaa uuden sukupolven kromosomitutkimuksen menetelmiä. PGT-A suoritettiin NGS-menetelmällä, jolloin tulokset ovat luotettavampia ja laaja-alaisempia. Tutkimuksen kohteena ollut alkio populaatio on maltillisen kokoinen, eivätkä tulokset ole suoraan yleistettävissä suurempaan vastaavaan populaatioon. Aineiston koon ja p-arvojen suuruuden huomioon ottaen tulokset voivat osaltaan johtua myös sattumasta. Suurempi aineisto mahdollistaisi entistä luotettavampien johtopäätelmien tekemisen.

Hedelmöitystapojen välillä havaittiin pieniä eroja muutamissa aspekteissa. ICSI:n havaittiin olevan tässä aineistossa nuorimman ikäryhmän kohdalla kannattavampi hedelmöitystapa aneuploidioiden tyyppinä verratessa ($p=0,015$): ICSI-alkiot olivat useammin euploidisia kuin IVF-alkiot. Muiden ikäryhmien keskuudessa ei havaittu eroja hedelmöitystapojen ja aneuploidian tyyppien välillä. Yhtenä mahdollisena tekijänä nuorimman ikäryhmän kohdalla IVF-alkioiden suhteellisen korkeaan aneuploidia-asteeseen voi olla pitkän inkubaatioajan aikaansaamien reaktiivisten happiyhdisteiden muodostuminen: näiden on osoitettu heikentävän alkion elinkykyisyyttä (Kattera ja Chen 2003). On mahdollista, että tämä vaikutus peittyi vanhemmilla ikäryhmillä, sillä ikäriippuisten aneuploidioiden määrän kasvaessa kokonaisaneuploidia-asteet kasvavat merkittävästi molemmilla hedelmöitystavoilla. Segmentaalisesti aneuploidisten kromosomien sijoittumisessa laajemmalle kromosomistoon on tässä aineistossa ICSI-alkioille ominainen piirre. Myös kromosomin 21 verraten korkea

aneuploidia-aste ICSI-alkioiden keskuudessa (17,4% ICSI, 9,4% IVF, $p=0,036$) mielenkiintoinen tulos. On kuitenkin huomioitava syyt, joille hedelmöitystavan valinta pohjautuu. Hedelmöitystapa valitaan potilaskohtaisten indikaatioiden mukaan, joka luo jo lähtöasetelmaltaan erilaiset lähtökohdat IVF- ja ICSI-alkioille. ICSI toimii pääasiallisena hedelmöitystapana vähäisestä siittiöiden määrästä tai niiden huonosta liikkuvuudesta kärsivien parien kohdalla. On osoitettu, että siittiösolujen hedelmällisyyteen vaikuttavien ongelmien vakavuuden kasvaessa myös aneuploidisten alkioiden määrä kasvaa (Magli ym. 2009). Näin ollen ICSI:n ja IVF:n välisiä eroavaisuuksia ei voida suoraan päätellä johtuvan hedelmöitystavasta, vaan syy voi löytyä tietyn hedelmöitystavan valinnan takana olevista indikaatioista.

Ikäryhmittäin vertailtaessa tärkeimpänä tuloksena voidaan pitää kromosomien 7, 8 ja 12 roolia mahdollisina laboratorio-olosuhteiden indikaattorikromosomeina. Vastaavaa laajamittaista, kromosomikohtaista aneuploidia-asteiden analyysiä on vaikea löytää muusta kirjallisuudesta. Tämä luo vaikeuksia saatujen tulosten arvioimiselle ja vertailulle. Nämä kromosomit kuitenkin osoittavat tässä aineistossa poikkeavan vähäistä ikäriippuvaisuutta. Rakennepiirteiltään nämä kromosomit eivät kuulu niiden kromosomien ryhmiin, joiden ajatellaan olevan erityisen alttiita aneuploidioiden kehittämiseksi (Franasiak ym. 2014A). Näiden kromosomien aneuploidia-asteet ovat myös suhteellisen korkeat verraten esimerkiksi Franasiak ym. (2014A) tutkimukseen, jossa yleisaneuploidia-astekin on tätä tutkimusta alhaisempi. Tulosten tulkinnassa tulee kuitenkin huomioida näiden tutkimusten välillä eroavat tutkimusmenetelmät, jonka vuoksi tulokset eivät ole täysin vertailukelpoisia. Näiden päätelmien pohjalta tätä tulosta voidaan kuitenkin pitää mielenkiintoisena ja potentiaalisena jatkotutkimusten kohteena.

On selvää, että naisen nouseva ikä on suurin ja merkittävin tekijä aneuploidia-asteiden kasvussa. Ulkoisilla tekijöillä voi kuitenkin olla uskottua suurempi rooli erityisesti kokonaisaneuploidia-asteeseen. Nykytiedon mukaan erityisesti hedelmöityshoitojen yhteydessä annettavien hormoniannosten määrän vaikutus munasolujen kypsymiseen ja meiotettiin jakautumisiin on todennäköinen (Nagaoka ym. 2013). Muiden laboratorioperäisten toimintatapojen ja olosuhteiden vaikutusta aneuploidia-asteisiin ei ole kromosomianalyysillä juuri onnistuneesti tutkittu vielä sopivien, spesifisten indikaattorien puuttuessa. Vastaavaa tutkimusta *in vitro*-olosuhteiden indikaattorikromosomeista ei ole julkaistu kirjallisuudessa. Myös laajamittaisia, uudemmillä kromosomitutkimuksen menetelmillä suoritettua koko kromosomiston kattavaa laajamittaista aneuploidia-asteiden ja niiden kehityksen vertailua on hyvin vähän. Tässä tutkimuksessa selvitettyjen, mahdollisten laboratorio-olosuhteiden indikaattoreiden roolia ja niiden paikkaansa pitävyyttä on mahdotonta analysoida kovin luotettavasti, kun kirjallisuutta ei ole paljoa ja olemassa olevaan kirjallisuuteen liittyy paljon sovellettavuusrajoitteita.

Tampereen Ovumia Fertinova Oy:ssä suoritettavan viljelyliuoskoikeilun aikana seurattaneen aneuploidia-asteiden kehitystä kokonaisaneuploidia-asteen lisäksi tutkimuksessa löydettyjen indikaattoreiden pohjalta. Huomiota tulee kiinnittää myös löydettyihin hedelmöitystapakohtaisiin eroihin. Tässä tutkimuksessa havaittujen, mahdollisten *in vitro*-olosuhteiden indikaattorien avulla eri tekijöiden vertailu voisi tulevaisuudessa olla mahdollista. Jatkotutkimuksissa sekä olemassa olevilla tutkimustiedoilla että tulevilla potilailla tulee tarkkailla näiden roolia ja kehitystä, jotta voidaan selvittää, toimivatko nämä indikaattorikandidaatit tosiaan sellaisina indikaattoreina, kuin tämän tutkimuksen tulosten perusteella voidaan ajatella. Olisi toivottavaa, että muut toimijat tekisivät ja julkaisisivat samankaltaista analyysiä ja tutkimusta, jotta vertailukelpoisia tuloksia saataisiin enemmän. Yhteisenä etuna tästä voidaan nähdä yleisen aneuploidiaymmärryksen kasvattaminen nykyaikaisilla metodeilla suoritettujen tutkimusten tulosten avulla. Myös laajamittaisesti laboratoriooperäisten aneuploidioiden hillitseminen voisi olla mahdollista, kun sopivia indikaattoreita näiden havaitsemiselle kyettäisiin määrittelemään. Näiden avulla voitaisiin tulevaisuudessa mahdollisesti tutkia aneuploidioiden syy-seuraussuhteita entistä tarkemmin ja kontrolloidummin.

LÄHTEET

- Babariya D., Fragouli E., Alfarawati S., ym. (2017) The incidence and origin of segmental aneuploidy in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction (Oxford, England)* **32**(12), 2549-2560.
- Chiang T., Schultz R. & Lampson M. (2012) Meiotic Origins of Maternal Age-Related Aneuploidy. *Biology of Reproduction* **86**(1), 1-7.
- Escribà M-J., Vendrell X. & Peinado V. (2019) Segmental aneuploidy in human blastocysts: a qualitative and quantitative overview. *Reproductive Biology and Endocrinology* **17**(7), 1-15.
- Franasiak J., Forman E., Hong K., ym. (2014A) Aneuploidy across individual chromosomes at the embryonic level in trophoctoderm biopsies: changes with patient age and chromosome structure. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **31**(11), 1501-1509.
- Franasiak J., Forman E., Hong K., ym. (2014B) The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertility and Sterility* **101**(3), 656-663.
- Handyside A. (2012) Molecular origin of female meiotic aneuploidies. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1822**(12), 1913-1920.
- Kattera S. & Chen C. (2003) Short coincubation of gametes in in vitro fertilization improves implantation and pregnancy rates: a prospective, randomized, controlled study. *Fertility and Sterility* **80**(4), 1017-1021.
- Kuliev A., Zlatopolsky Z., Kirillova I., ym. (2011) Meiosis errors in over 20,000 oocytes studied in the practice of preimplantation aneuploidy testing. *Reproductive BioMedicine Online* **22**(1), 2-8.
- Magli M., Gianaroli L., Ferraretti A., ym. (2009) Paternal contribution to aneuploidy in preimplantation embryos. *Reproductive BioMedicine Online* **18**(4), 536-542.
- Munné S., Alikani M., Ribustello L., ym. (2017) Euploidy rates in donor egg cycles significantly differ between fertility centers. *Human Reproduction* **32**(4), 743-749.
- Nagaoka S., Hassold T. & Hunt P. (2013) Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nature Reviews Genetics* **13**(7), 493-504.
- Palmerola K., Vitez S., Amrane S., ym. (2019) Minimizing mosaicism: assessing the impact of fertilization method on rate of mosaicism after next-generation sequencing (NGS) preimplantation

genetic testing for aneuploidy (PGT-A). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **36**(1), 153-157.

Rabinowitz M., Ryan A., Gemelos G., ym. (2012) Origins and rates of aneuploidy in human blastomeres. *Fertility and Sterility* **97**(2), 395-401.

Sahin L., Bozkurt M., Şahin H., ym. (2017) To compare aneuploidy rates between ICSI and IVF Cases. *Nigerian Journal of Clinical Practice* **20**(6), 652-658.

Sills E., Li X., Frederick J., ym. (2014) Determining parental origin of embryo aneuploidy: analysis of genetic error observed in 305 embryos derived from anonymous donor oocyte IVF cycles. *Molecular Cytogenetics* **7**(1), 68.

Stolakis V. & Bertero M. (2019) Molecular aspects of aneuploidy in preimplantation human embryos: a mini-review. *Annals of Research Hospitals* **3**(8), 1-12.

Swain J. (2019) Controversies in ART: can the IVF laboratory influence preimplantation embryo aneuploidy? *Reproductive BioMedicine Online* **39**(4), 599-607.

LIITE 1: KROMOSOMIKOHTAISET ANEUPLOIDIA-ASTEET IKÄRYHMITTÄIN

Taulukko 1: Kromosomikohtaiset aneuploidia-asteet ikäryhmittäin taulukoituna. Harmaat tietopalkit kuvaavat aneuploidia-asteiden keskinäisiä suhteita. Viimeisessä sarakkeessa on esitetty myös jokaiselle kromosomille p-arvo iän ja aneuploidia-asteen yhteydestä. Keltaisella on korostettu merkittävän korkeat p-arvot. Vihreällä on korostettu raja arvon <0,05 alittavat p-arvot.

Kromosomi	Aneuploidioiden osuudet (%) ikäryhmittäin					p-arvo (Mann-Whitney U-testi)
	≤ 35 vuotta	36-39 vuotta	40 vuotta	41 vuotta	≥ 42 vuotta	
1	2,2 %	3,8 %	4,7 %	7,6 %	1,8 %	0,653
2	4,4 %	1,3 %	3,1 %	5,4 %	7,1 %	0,142
3	2,2 %	1,3 %	1,6 %	3,3 %	3,6 %	0,503
4	6,7 %	1,3 %	3,1 %	7,6 %	3,6 %	0,628
5	0,0 %	1,3 %	6,3 %	6,5 %	1,8 %	0,165
6	0,0 %	3,8 %	0,0 %	4,3 %	0,0 %	0,901
7	6,7 %	5,0 %	7,8 %	6,5 %	3,6 %	0,816
8	4,4 %	5,0 %	6,3 %	4,3 %	3,6 %	0,786
9	0,0 %	2,5 %	1,6 %	5,4 %	12,5 %	0,001
10	2,2 %	2,5 %	0,0 %	8,7 %	7,1 %	0,025
11	2,2 %	0,0 %	4,7 %	2,2 %	7,1 %	0,023
12	2,2 %	2,5 %	7,8 %	4,3 %	1,8 %	0,93
13	2,2 %	3,8 %	9,4 %	8,7 %	16,1 %	0,015
14	2,2 %	3,8 %	7,8 %	3,3 %	14,3 %	0,017
15	2,2 %	10,0 %	12,5 %	20,7 %	16,1 %	0,009
16	11,1 %	11,3 %	10,9 %	10,9 %	21,4 %	0,11
17	0,0 %	2,5 %	7,8 %	6,5 %	16,1 %	0,000152
18	2,2 %	5,0 %	1,6 %	8,7 %	7,1 %	0,122
19	0,0 %	6,3 %	7,8 %	12,0 %	10,7 %	0,017
20	0,0 %	5,0 %	4,7 %	7,6 %	10,7 %	0,017
21	6,7 %	10,0 %	9,4 %	20,7 %	14,3 %	0,039
22	6,7 %	15,0 %	18,8 %	19,6 %	16,1 %	0,147