

Pauliina Hautala

ALKIONKEHITYKSEN KINETIIKAN JA MORFOLOGIAN YHTEYS ANEUPLOIDIAAN

Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Kandidaatintyö
Huhtikuu 2020

ABSTRAKT

Pauliina Hautala: Kinetiken och morfologin under fosterutvecklingen och dess påverkan på aneuploiditeten
Kandidatexamen
Tammerfors Universitet
Kandidatprogrammet i Bioteknologi
April 2020

Alla avvikelser i människans diploida kromosomuppsättning (46XX, 46XY) kallas gemensamt för aneuploidi. Aneuploidi är ett allmänt förekommande tillstånd som, med endast några undantag, leder alltid till implantationsdugliga embryon och missfall under första trimestern. Största delen av misslyckade provrörsbefruktningar beror på omedveten överförning av aneuploida blastocyster. Kromosomavvikelser förekommer i över hälften av alla embryon som nått blastocyststadiet. Därför används olika screeningsmetoder i IVF behandlingar för att välja ut den mest fortplantningsdugliga blastocysten. Ett exempel på en robust screeningsmetod är PGT-A som står för *Preimplantation genetic testing for aneuploidy*. Med hjälp av PGT-A får patienterna garanterat överförning av endast euploida embryon och sannolikheten för oönskade händelser såsom missfall förminskar rejält.

Användningen av intervall, eller time-lapse analys tekniken har revolutionerat embryoforskningen. EmbryoScope är ett exempel på ett apparatur som utnyttjar time-lapse teknologin och är försedd med en inbyggd kamera och mikroskop. I EmbryoScope odlas embryon i inkubatormiljön utan att behöva utsätta dem för fysikaliska (pH, temperatur) förändringar. Apparaten sammanställer en video av bilderna som tagits under odlingen (befruktad äggcell -> 50-200 cellig blastocyst) och ger möjligheten att studera utvecklingen i tillbakablickande syfte.

I denna retrospektiva studie har sammanlagt 272 fosterutvecklingsvideon analyserats från 71 olika behandlingsgångar. För att inte påverka slutresultatet, gjordes alla analyser förblindade för den möjliga aneuploiditeten. Utvecklingen analyserades med EmbryoScope utifrån 8 morfokinetiska parametrar som i tidigare studier kopplats och utsetts som riskfaktorer för aneuploidi. Med morfokinetiken menas mätbara och observerbara händelser i embryodynamiken som sker under olika tidpunkter i utvecklingen och kan analyseras med TL-teknologin.

PGT-A utfördes för alla 282 embryon varav resultatet ficks av 272. Av alla biopserade blastocyster var 69,5% aneuploida (189/272). Eftersom siffran var så högt, understryker den PGT-A:s roll som screeningsmetod i lyckade IVF-behandlingar. I våra resultat lyckades vi inte hitta något samband mellan aneuploiditeten och parametrarna i de allra tidigaste skeden i utvecklingen. Enligt denna undersökning var en långsam utvecklingshastighet den mest anmärkningsvärda parametern och riskfaktorn för aneuploidi. Hastigheten mättes med parametern, som tog tid på intervallet från PNFade till början av blastocyststadiet (tSB). Utvecklingens mediantider dröjde över 6 timmar längre hos aneuploida blastocyster (76,8h jämfört med 70,6h hos euploida). Eftersom endast ett embryo var euploid när tiden översteg 90h, behövs det i fortsättningen noggrann bedömning av överföringsdugligheten hos dessa embryon. PGT-A bör rekommenderas för patienter med långsam >90h utvecklingshastighet och möjligen bör dessa blastocyster undvikas helt och hållet.

TIIVISTELMÄ

Pauliina Hautala: Alkionkehityksen kinetiikan ja morfologian yhteys aneuploidiaan
Kandidaatintutkielma
Tampereen yliopisto
Bioteknologian tutkinto-ohjelma
Huhtikuu 2020

Kaikkia poikkeamia ihmisen diploidisessa kromosomistossa (46XX, 46XY) kutsutaan yhteisnimityksellä aneuploidiaksi. Aneuploidia on yleisesti esiintyvä ilmiö, joka melkein kaikissa tapauksissa johtaa siirtokelvottomiin alkioihin tai keskenmenoihin raskauden ensimmäisellä kolmanneksella. Suurin osa epäonnistuneista hedelmöityshoidoista johtuu aneuploidiasta tietämättömänä tehdyistä alkionsiirroista. Kromosomipoikkeamia esiintyy yli puolessa blastokystivaiheeseen kehittyneistä alkiosta. Tämän takia on hedelmöityshoitoja varten kehitetty erilaisia alkioiden seulontamenetelmiä, joiden avulla siirtoon pystytään valitsemaan kaikista tervein ja kromosomistoltaan normaali alkio. Esimerkki vankasta ja lujatekoisesta seulontamenetelmästä on PGT-A (preimplantation genetic testing for aneuploidy). PGT-A:n avulla potilaille voidaan luvata siirtoon ainoastaan euploideja alkioita. Tämän yhteydessä vähenevät epätoivotut tapahtumat, kuten esimerkiksi keskenmenot.

Alkiotutkimus on mullistunut markkinoille tulleen aikaviivekuvauksen (time-lapse) myötä. EmbryoScope on esimerkki time-lapse teknologiaa hyödyntävästä laitteistosta, joka on varusteltu sisäänrakennetulla kameralla ja mikroskoopilla. Embryoskoopissa alkiot viljellään inkubaattoriolosuhteissa, eikä niitä tarvitse altistaa fysikaalisille (pH, lämpötila) muutoksille. Laitteisto koostaa viljelyn aikana otetuista kuvista videon (hedelmöittynyt munasolu -> 50-200 soluinen blastokysti) ja tarjoaa mahdollisuuden tutkia alkioita reaaliaikaisesti ja retrospektiivisesti.

Tässä retrospektiivisessä tutkimuksessa on analysoitu 272 alkionkehitysvideota 71 eri hoitokerralta. Koska lopputuloksiin ei haluttu vaikuttaa, tehtiin analysointi tietämättömänä alkion mahdollisesta aneuploidiasta. Kehitystä analysoitiin embryoskoopilla 8 morfokineettisen parametrin osalta. Niitä on aiemmissa tutkimuksissa ehdotettu aneuploidian riskitekijöiksi. Morfokinetiikalla tarkoitetaan TL-teknologialla mitattavissa ja havaittavissa olevia, eri kehityshetkillä tapahtuvia embryodynamiikan muutoksia.

PGT-A tehtiin yhteensä 282 alkiolle, joista tulos saatiin 272:sta. Kaikista biopsoiduista blastokysteistä 69,5% oli aneuploidisia (189/272). Koska luku oli niin korkea, painottaa se PGT-A:n ja alkioseulonnan suurta merkitystä onnistuneissa hedelmöityshoidoissa. Tässä tutkimuksessa ei löydetty yhteyttä alkionkehityksen varhaisessa vaiheessa tutkittujen parametrien ja aneuploidian välillä. Tutkimustulosten perusteella hidas kehittymisnopeus osoittautui merkittävimäksi parametrikseksi ja aneuploidian riskitekijäksi. Kehittymisnopeutta tutkittiin parametrilla, joka mittasi aikaa esitumien häviämisestä (PNfade) pienen blastokystin muodostumiseen (tSB). Kehityksen keston mediaani oli yli 6 tuntia pidempi aneuploideilla alkiolla (76,8h vrt. 70,6h euploideilla). Ainoastaan yksi hyvin hidasta kehittymisnopeutta (>90h) osoittanut alkio oli euploidinen. Tuloksien perusteella hitaiden alkioiden siirtopotentiaalia tulee jatkossa arvioida hyvin tarkasti. PGT-A:ta tulee suositella potilaille, joiden alkiot ovat osoittaneet hidasta (>90h) kehittymisnopeutta ja mikäli mahdollista, tulisi näitä alkioita välttää kokonaan.

Avainsanat: Aneuploidia, TL-analyysi, PGT-A.

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

ALKUSANAT

Ensimmäiseksi haluan kiittää koko Ovumia Fertinovan Tampereen klinikan henkilökuntaa avusta, tuesta ja ystävällisyydestä. Etenkin kiitokset kättilö Ninni Wärelle työhuoneensa jakamisesta ja mukavista työpäivistä. Suurimmat kiitokset kuuluvat ohjaajalleni, Ovumian kehityspäällikkö ja PGT-A asiantuntija Peter Bredbackalle. Kiitos, että olet haastanut ja tukenut minua koko projektin aikana ja auttanut kehittymään paremmaksi. Olet alan todellinen asiantuntija, ja kanssasi oli hienoa ja antoisaa tehdä yhteistyötä.

Seuraavaksi haluan kiittää kaikkia työkavereitani Kotipizza Pirkkalassa ja Uplakers Taitolusteluistelu- ja taitolusteluseurassa. Kiitos esimiehilleni Kotipizza Pirkkalan yrittäjille Sirpa Uzunille ja Päivi Kankaanpäelle, sekä Uplakers Taitolustelun valmennuspäällikölle Maija Seppäselle tuesta, luottamuksesta, vastuusta ja työympäristöstä, jonne on aina kiva tulla töihin. Olette tarjonneet minulle loistavan pakopaikan akateemisesta maailmasta ja auttaneet sekä fyysisessä että henkisessä jaksamisessa.

Haluan kiittää myös perhettäni ja rakkaita ystäviäni. Olen äärimmäisen kiitollinen teidän tarjoamasta tuesta ja luottamuksesta. Arvostan sitä, että annatte minulle tilaa ja aikaa tehdä töitä unelmieni eteen, olette kultaakin arvokkaampia. Sekä lopuksi rakkaalle miehelleni Aleksille. Tukesi on ollut korvaamaton, enkä malta odottaa, mitä tulevaisuudella on meitä varten.

Tampereella, 29.4.2020

Pauliina Hautala

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	5
2. MATERIAALIT JA METODIT	7
2.1 Tutkimussuunnitelma	7
2.2 Embryoskooppiviljely	7
2.3 Aikaviivekuvaus ja TL-analyysi.....	10
2.4 Morfokineettisten parametrien tarkastelu	10
2.5 PGT-A.....	13
3. TULOKSET	14
3.1 Epätasaiset jakautumiset	14
3.2 Monitumaisuus epätasaisesti ja normaalisti jakautuneiden välillä.....	15
3.3 Esitumat (PN) ja niissä havaitut poikkeamat	15
3.4 Kineettisten parametrien arviointi	16
4. YHTEENVETO	18
5. LÄHTEET	20

1. JOHDANTO

Suomessa tehdään vuosittain 12 000 – 14 000 hedelmöityshoitoa. Vuonna 2017 hedelmöityshoitajien avulla Suomeen syntyi 2 336 lasta, mikä vastasi 4,8% kaikista syntyneistä (<https://thl.fi/fi/tilastot-ja-data/tilastot-aiheittain/seksuaali-ja-lisaantymisterveys/hedelmoytishoidot>, 29.3.2020). Yksi yleisimmistä syistä hedelmöityshoitoihin hakeutumiselle ovat toistuvat keskenmenot sekä korkeasta iästä johtuvat vaikeudet tulla raskaaksi (Rubio ym. 2003). Merkittävänä syynä raskauden ensimmäisellä kolmanneksella tapahtuviin keskenmenoihin on alkioiden kromosomipoikkeavuudet, kuten aneuploidia (Rubio ym. 2003, Penzias ym. 2018). Aneuploidialla tarkoitetaan alkion yksittäisissä kromosomeissa esiintyvää monosomiaa tai trisomiaa.

Monosomiaa ja trisomiaa esiintyy noin 10% kaikista raskauksista, mutta osuus voi ylittää jopa 50% naisen lähestyessä vaihdevuotia (Piccolomini ym. 2016). Naisen korkea ikä on siten suurin aneuploidian riskitekijä (Desai ym. 2018). Desai ym. biopsioivat tutkimuksessaan 767 blastokystivaiheeseen kehittyntä alkioita, joista 41,6% osoittautuivat euploidisiksi. Euploidisuusaste kuitenkin laski merkittävästi potilaan korkean iän myötä ja oli yli 38 vuotiaiden naistetsyn kohdalla ainoastaan 31,2% (Desai ym. 2018). Laskusuuntaista euploidisuusasetetta raportoivat tutkimuksissaan myös Minasi ym. 2016 osoittaessaan aneuploidisuuden yleistyvän noin 10 %:lla naisen jokaisena ikävuonna.

Alkion kromosomitutkimuksessa (PGT-A= *Preimplantation testing for aneuploidy*) pyritään seulomaan aneuploidiaa alkioista otetun, noin 5-8 solun biopsian avulla. Tutkimuksesta hyötyvät eniten yli 37 vuotiaat potilaat, mutta myös nuoremmat, useita tuloksettomia hoitokertoja läpikäyneet potilaat (Rubio ym. 2003, Penzias ym. 2018). PGT-A seulonnan tavoitteena on siirtää kohtuun kaikista terveimmät ja parhaimmat selviytymismahdollisuudet omaavat, kromosomistoltaan normaalit alkio. PGT-A toimii järeänä työkaluna valinnaisessa alkionsiirrossa (eSET= *elective single embryo transfer*), jossa siirtoon valitaan ainoastaan yksi useamman potentiaalisen alkion joukosta. PGT-A:n avulla eSET hoitojen keskenmenoriskit ovat vähentyneet, minkä seurauksena raskaustulokset ovat parantuneet (Fiorentino ym. 2014).

Alkionkehityksen tutkiminen ja seuraaminen on mullistunut aikaviive-, eli time-lapse (TL) kuvantamisen myötä. Aikaviivekuvaus on mahdollista markkinoille tulleiden, kameralla varustettujen TL-inkubaattorilaitteistojen avulla. Aiemmin alkioita otettiin ulos inkubaattorista päivittäistä arviointia varten. Arvioinnin yhteydessä ne altistuivat fysiologisille häiriöille, kuten lämpötilan ja pH:n muutoksille. Ainoastaan murto-osa alkioiden kinetiikkasta ja solusykli tapahtumista oli mahdollista analysoida mikroskooppitarkastelun yhteydessä. Esimerkiksi

kaikki yöaikana tapahtuneet solujakautumiset sekä solujen interfaasissa näkyvä tumien lukumäärä jäivät morfologian analysoinnin ulkopuolelle. TL- teknologian myötä päätös siirtoon valittavasta alkioista on mahdollista tehdä täysimittaisen viljelyvideon perusteella, jossa alkiossa tapahtuvat solusykli tapahtumat ja muutokset alkiodynamiikassa pystytään näkemään ja arvioimaan (Desai ym. 2018). TL-analyysi tarjoaa mahdollisuuden tulkita morfokineettisten parametrien yhteyttä PGT-A tuloksiin sekä reaaliaikaisesti että retrospektiivisesti. Morfokineetikalla tarkoitetaan TL-analyysillä tulkittavissa olevia alkiodynamiikan muutoksia eri kehitysvaiheissa. Alkiovalinnassa analyysistä on suurta hyötyä riippumatta siitä, päädytäänkö potilaan hoidossa käyttämään PGT-A:ta vai ei. Ensimmäinen TL- kuvantamisen avulla tehty blastokystien luokittelu kolmeen riskiryhmään aneuploidian osalta (matala, tavallinen ja korkea) tehtiin Campbell ym. toimesta vuonna 2013.

Epätasaiset jakautumiset ovat morfokineettisiä poikkeamia, joita voidaan tutkimuksien perusteella pitää merkinä aneuploidiasta ja alkion huonoista selviytymismahdollisuuksista (Zhan ym. 2016). Aneuploidiaa voivat aiheuttaa esimerkiksi hedelmöittyneen munasolun jakautuminen suoraan yhdestä solusta kolmeen (1->3) tai kahdesta solusta viiteen (2->5). Näissä poikkeustapauksissa sukkularihmasto ei välttämättä ole muodostunut oikein, mikä voi johtaa kromosomien epätasaiseen jakautumiseen ja aiheuttaa aneuploidiaa (Vera-Rodriguez ym. 2015). Epänormaaleja jakautumisia läpikäyneet alkioit voivat kuitenkin kehittyä euploideiksi, mikä on osoitus niiden suuresta mukautumiskyvystä ja itsekorjautuvuudesta (Lagalla ym. 2017). Alkioissa esiintyvien poikkeamien TL-analysointi on ajankohtainen ja merkityksellinen aihe, sillä mikään tutkimus ei ole vielä kyennyt löytämään jokaiseen tilanteeseen sopivia parametrejä, joiden avulla aneuploidia olisi ennustettavissa (Vera-Rodriguez ym. 2015).

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli analysoida TL-alkiovideot ennalta määriteltujen parametrien osalta. Tietojen avulla olisi mahdollista joissakin tapauksissa ohjata potilaat tekemään PGT-A tai vaihtoehtoisesti peruuttaa PGT-A ja siirto joidenkin, merkittäviä poikkeamia läpikäyneiden alkoiden kohdalla. Parametrit valittiin yksiselitteisesti, jotta ne olisivat tulkittavissa mahdollisimman objektiivisesti ja samankaltaisesti useimpien embryologien toimesta.

2. MATERIAALIT JA METODIT

2.1 Tutkimussuunnitelma

Tässä retrospektiivisessä tutkimuksessa analysoitiin 282 alkioviljelyvideota 71 eri hedelmöityshoitokerralta. Kaikki tutkimukseen osallistuneet hedelmöityshoidot tehtiin Ovumia Fertinovan Tampereen klinikan toimipisteessä aikavälillä toukokuu 2016 – tammikuu 2020. Mukana oli maljahedelmöityksellä (IVF) ja mikroinjektiolla (ICSI) hedelmötetyt EmbryoScope® (Vitrolife) inkubaattorissa viljellyt alkiot. Inkubaattoria kutsutaan tästedes embryoskoopiksi. Potilaan ikä munasolujen keräyspäivänä asetettiin jokaisen alkion ominaisuudeksi. Vastaavasti luovutettuja munasoluja käytettäessä luovuttajan ikä munasolujen keräyshetkellä merkittiin alkioden ominaisuudeksi. Kaikista alkioista oli saatavilla PGT-A tuloksien lisäksi embryoskoopin kuvaama videotallenne kehityksestä hedelmöityksen alusta 5-6 päivään, kunnes ne biopsoitiin. Potilaiden yksityisyyttä kunnioitettiin jokaisessa tutkimuksen vaiheessa ja henkilötietoja käytettiin ainoastaan välttämättömään tiedonkeruuseen.

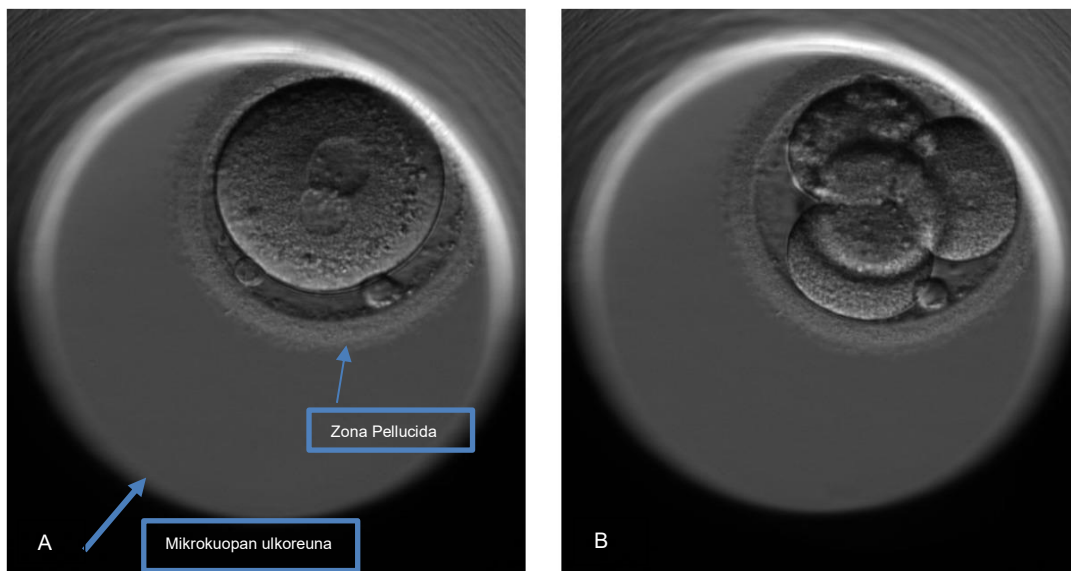
2.2 Embryoskooppiviljely

Hedelmöittyneitä munasoluja viljeltiin 5-6 päivän ajan erityisillä, numeroiduilla 12-paikkaisilla EmbryoSlide® viljelymajoilla (Vitrolife Kuva 1). Jokaisen kuopan pohjalla on vielä toinen, halkaisijaltaan 250 µm oleva mikrokuoppa, jonne munasolu pipetoidaan. Asetelmasta käytetään nimitystä Well-of-the-Well (Vajta ym. 2008) ja sen tarkoituksena on pitää alkio mikrokuopassa paikallaan kuvantamista varten. Jokaiseen kuoppaan pipetoitiin 25 mikrolitraa Origio SAGE 1-step viljelyliuosta. Kuoppien päälle pipetoitiin lisäksi öljyä (Origio Paraffin Oil) estämään viljelyliuoksen haihtumista. ISCI-hoidoissa maljat valmistettiin hedelmöitystä edeltävänä päivänä ja jätettiin tasapainottumaan tavalliseen inkubaattoriin. Maljahedelmöityshoidoissa (IVF) maljat valmisteltiin samana päivänä, kun hedelmöitykset tehtiin ja hedelmöittyneet alkiot siirrettiin maljoille seuraavan päivän aamuna. Viljelyolosuhteet pidettiin mahdollisimman tasaisina mukaillen kohdussa vallitsevaa ympäristöä $T = 37^{\circ}\text{C}$, 6% CO_2 ja 6% O_2 . Embryoskoopin sisäänrakennettu kamera kuvasi viljelyn aikana jokaisen kuopan 10 minuutin välein 7 eri polttotasossa. Eri polttotasoissa otetut kuvat mahdollistivat alkioden paremman kolmiulotteisen hahmottamisen morfokinetiikan analysointia varten. Embryoskoopin ottamissa kuvissa reunuksina toimivat mikrokuopan ulkoreunat ja alkio on paikallaan joko mikrokuopan keskellä tai reunassa (Kuva 2).



Kuva 1 EmbryoScope ja EmbryoSlide viljelymalja, jonka Well of the Well teknologia mahdollistaa zygoottien paikallaanpysymisen kuopan 250 μm mikrokuopassa. (Embryoscope and EmbryoSlide culture dish, Vitrolife, (<https://www.vitrolife.com/products/time-lapse-systems/embryoscope-time-lapse-system/>, 29.4.2020)

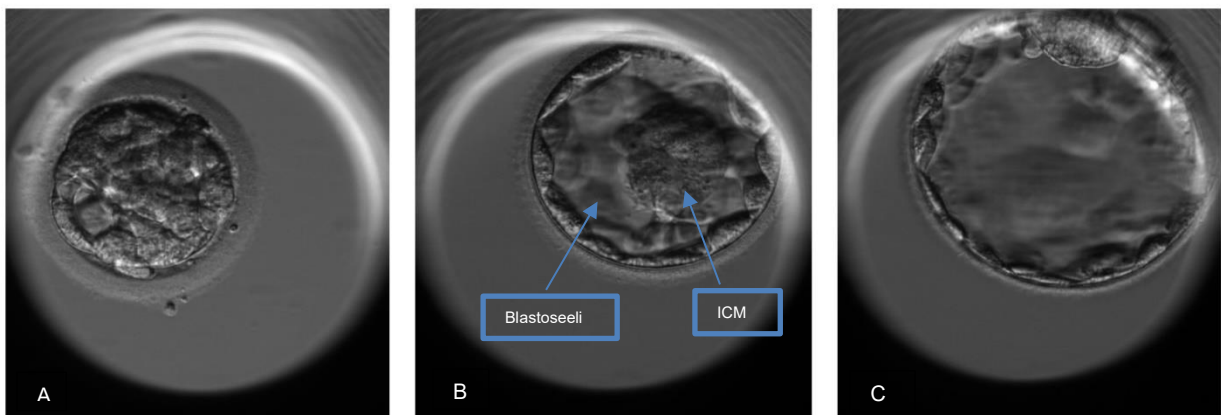
Embryoskooppi tarjoaa vakaan inkubaattoriympäristön alkoiden kasvuille. Viljelyn aikana hedelmöittynyt munasolu kasvaa blastokystiksi, jossa on noin 50-200 solua. Ennen ensimmäistä mitoottista solujakautumista hedelmöittyneessä munasolussa on nähtävissä esitumat, eli pronukleukset (Kuva 2A). Tuman ja sytoplasman erottajana toimineen tumakotelon hajoaminen aiheuttaa pronukleuksien häviämisen kuvasta, jota seuraa ensimmäinen mitoottinen jakautuminen. Yleisesti kahden ensimmäisen solujakautumisen kohdalla solujen, eli blastomeerien, tumat ovat nähtävissä pronukleuksien tavoin (Kuva 2).



Kuva 2 Zygootti, jossa nähtävillä molemmat pronukleukset (PN) n. 18h hedelmöityksestä (A). 4-soluvaiheessa oleva hieman fragmenttia sisältävä alkio (B). Blastomeerit ovat kooltaan sopusuhtaisia ja muodostavat stabiilin tetraedrisen konformaation. Lisäksi kahden blastomeerin tumat ovat näkyvissä. (Kuvat: EmbryoScope)

Solusyklin yleinen kesto on noin 10-12h. Tuossa ajassa solu ehtii palautumaan sytokineesistä, kasvamaan ja replikoimaan DNA:nsa (Vera-Rodriguez ym. 2015). Liian nopeassa, alle 10h kestävässä solusyklissä genomi saattaa jakautua epätasaisesti blastomeerien kesken aiheuttaen aneuploidiaa (Zhan ym. 2016). 8-soluvaiheen jälkeen blastomeerit alkavat pakkautua, eli kompaktoitua, muodostamalla tiiviitä liitoksia toistensa kanssa. Morulaksi kutsutaan kompaktoitunutta alkioita, josta ei kyetä enää selkeästi erottamaan yksittäisiä soluja. Alkio saattaa kuitenkin jättää mahdollisesti geneettisesti vioittuneita soluja kompaktoitumisen ulkopuolelle (Lagalla ym. 2017). Vaikka hylätyt solut olivat embryoskoopilla nähtävissä, eivät ne hylkäämisen jälkeen enää jakautuneet. Mikäli soluista ei kyetty erottamaan tumarakennetta, tulkittiin ne silloin suuriksi fragmenteiksi.

Neljännän päivän kohdalla alkion uloimmat solut aloittavat erilaistumisen trofektodermin soluiksi. Näistä soluista kehittyä myöhemmin istukka. Erilaistumisen aikana videoilla on nähtävissä onkaloituminen (Kuva 3A), jonka ilmennyttyä alkioita kutsutaan pieneksi blastokystiksi (SB = Small blastocyst). Blastokystin sisäosa koostuu solurykelmänä näkyvästä sisäsolumassasta (ICM) sekä blastoseeliksi kutsutusta nesteonkalosta (Kuva 3 B ja C). Blastokysti pyrkii lopulta kuoriutumaan zona pellucidan muodostamasta kuoresta. Laajentuneen blastokystivaiheen ja biopsointivalmiuden (Kuva 3 C) alkio saavuttaa koostuessaan yli 100 solusta, joilla on venyttävä ja ohentava vaikutus zona pellucidaan.



Kuva 3 Onkaloituminen aikaisessa blastokystivaiheessa (Ajanhetki tSB) (A) 5 päivän blastokysti, jossa zona pellucida hieman ohentunut. Trofektodermin solut erottuvat ulkopuolella ja sisäsolumassan pakkautuessa solun sisälle (B). Suuri 6 päivän blastokysti, jossa ohut kerros zona pellucida jäljellä (C). (Kuvat: EmbryoScope)

2.3 Aikaviivekuvaus ja TL-analyysi

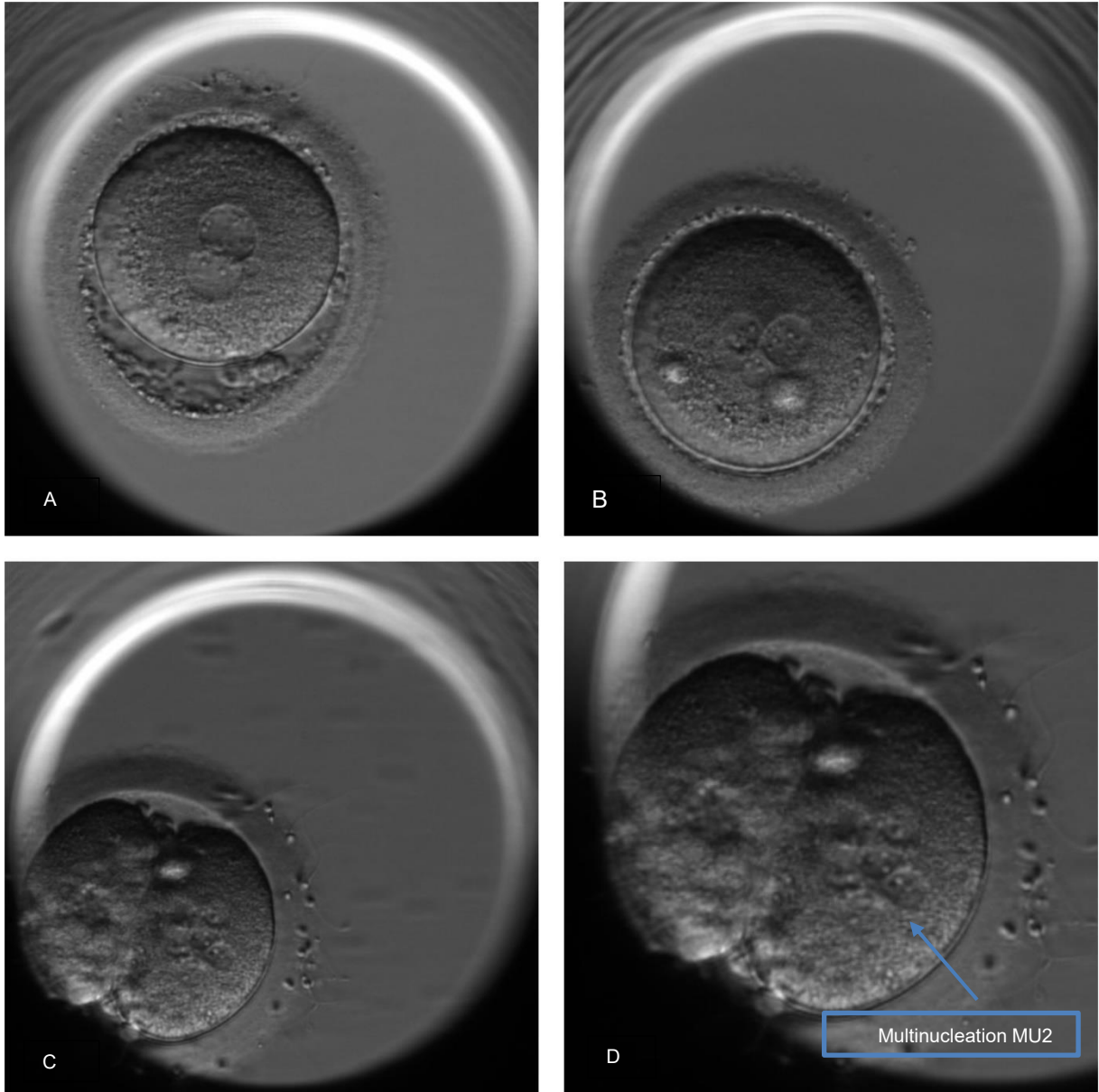
Embryoskooppi tallensi videon alkion kehityksestä hedelmöitymisestä 5. tai 6. päivän biopsointivaiheeseen asti. Mikroinjektiolla (ICSI) hedelmöitettyjen alkoiden kohdalla embryoskooppi ajastettiin aloittamaan ajanlasku injektion ajanhetkellä. Suurin osa alkioista siirrettiin embryoskooppiin alle tunnin päästä hedelmöityksestä mahdollistaen niiden yhdenvertaisen tarkastelun. Maljahedelmöityksessä (IVF) ajanlasku alkoi sillä hetkellä, kun siittiöt ja munasolut laitettiin samalle maljalle. Hedelmöitysmenetelmästä riippumatta kaikki tuloksissa esitetyt ajat on esitetty tunteina (h) hedelmöitysprosessin aloitushetkestä.

Videot analysoitiin retrospektiivisesti embryoskoopin hitaimmalla nopeudella. Videoista suurin osa oli valmiiksi annotoitu solujakautumisten ajankohdalta, mikä helpotti tärkeiden ajanhetkien merkitsemistä tuloksiin. Videota pystyttiin lisäksi kelaamaan hidastetusti eteen- ja taaksepäin, minkä avulla esimerkiksi blastokystin onkaloitumisen ajankohta (tSB, Kuva 2A) oli mahdollista annotoida kymmenen minuutin tarkkuudella.

Etenkin ensimmäisten epätasaisten solunjakautumisten kohdalla ulos purskahtanut solumassa aiheuttaa fragmentaatiota alkion ympärille. Fragmentit ovat nestettä sisältävää, solujen erittämää ”jätettä”, joka hylätään alkion ulkopuolelle. Fragmenttien prosentuaalista osuutta käytetään yhtenä arviointikriteerinä monissa blastokystien arviointimalleissa (Desai ym. 2018). Pienet fragmentit haittaavat näkyvyyttä alkion ympärillä vaikeuttaen todellisen solumäärän laskemista ja monitumaisuuden havaitsemista. Arviointia on kuitenkin mahdollista helpottaa kuvan polttotasoa muuttamalla.

2.4 Morfokineettisten parametrien tarkastelu

Osa tutkittavista 8 parametreistä valikoitui aiemmissä tutkimuksissa havaittujen, mahdollisesti aneuploidiaa aiheuttavien morfokineettisten poikkeamien perusteella. Kaikki tutkimuksessa analysoidut parametrit sekä niiden lyhenteet on selitetty Taulukossa 1. Lisäksi kaksi helpommin kuvien avulla havainnollistettavaa poikkeamaa on esitelty Kuvassa 4. Esimerkiksi epätasaiset solujakautumiset (1->3, 2->5) ja monitumaisuudet 2- ja 4-soluvaiheessa (Kuva 4 C ja D) ovat TL-analyysillä helposti havaittavia, mahdollista aneuploidiaa ennustavia morfokineettisiä poikkeamia (Desai ym. 2018, Lagalla ym. 2017). Näiden lisäksi arvioimme 1-soluvaiheessa (hedelmöittynyt munasolu) poikkeamia pronukleuksien (PN) lukumäärässä ja koossa (Kuva 4 A ja B). Epätasaisesti jakautuvien alkoiden ryhmään lisäsimme seurattavaksi myös mahdollisesti aneuploidiaa aiheuttavan käänteisen jakautumisen. Käänteisellä jakautumisella (RC= Reverse Cleavage) tarkoitetaan 8-soluvaiheeseen asti näkyvissä olevaa ilmiötä, jossa juuri toisistaan erkaantuneet tumalliset solut fuusioituvat takaisin yhdeksi soluksi.



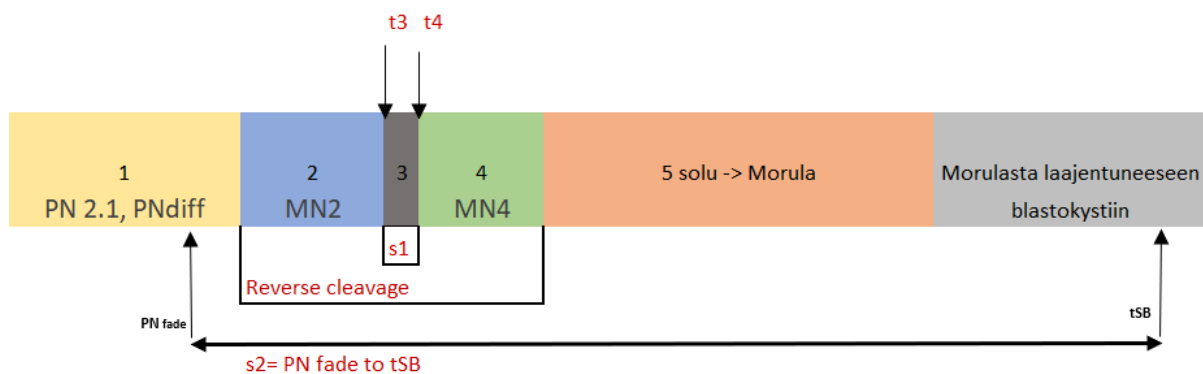
Kuva 4 Hedelmöitynyt munasolu, joka sisältää kahden pronukleuksen lisäksi vielä yhden, merkittävästi pienemmän PN:nnän ja tulkittiin poikkeamana PN2.1 (A). 4 erikokoista pronukleusta sisältävä munasolu. Tulkittiin sisältävän poikkeamat (PN4 ja PNdiff) (B). Kaksi kuvaa samasta alkioista 2-soluvaiheessa, jossa monitumaisuus, eli multinucleation nähtävissä kummassakin blastomeerissä. Alkio täytti MU2 poikkeaman kriteerit (C ja D) Kuvat EmbryoScope.

Ajanjakson s2 avulla mitattiin aikaa pronukleuksien häviämisestä (tPNfade) pienen blastokystin muodostumiseen (tSB). Aiemmat tutkimukset ovat tukeneet väitettä hitaan alkionkehityksen ja aneuploidian välisestä mahdollisesta yhteydestä (Vera-Rodriguez ym. 2015, Piccolomini ym. 2016). Kehittymisnopeuden mittareiksi valittiin sellaiset aikapisteet, joissa muutokset tapahtuivat hyvin nopeasti ja selkeästi. Tällöin ajanhetket olivat tarkasti mitattavissa mahdollistaen alkioden kehittämissopeuksien vertailun. Esimerkiksi esitumien häviäminen (tPNfade) kesti alle 10 minuuttia, sillä muutos tapahtui kahden peräkkäisen kuvan välissä

Taulukko 1 Tutkittujen morfokineettisten poikkeamien kuvaukset

	POIKKEAMAN KUVAUS
PN2.1	Kahden samansuuruisten pronukleuksien lisäksi ainakin yksi pienempi PN (Kuva 4A)
PNdiff	Pronukleuksien merkittävä kokoero (Kuva 4 A ja B)
tPNfade	Esitumien häviäminen
MN2	Monitumaisuus 2-soluvaiheessa (Kuva 4 C ja D)
MN4	Monitumaisuus 4-soluvaiheessa
T3	Ajanhetki, kun 2-soluvaiheen ensimmäinen blastomeeri jakautuu ja alkio koostuu 3 solusta
t4	Ajanhetki, kun 2-soluvaiheen toinen blastomeeri jakautuu ja alkio koostuu 4 solusta
1 -> 3	Jakautuminen 1 solusta suoraan 3 soluksi, tulkitaan epätasaiseksi jakautumiseksi
2 -> 5	Jakautuminen 2 solusta suoraan 5 soluksi, tulkitaan epätasaiseksi jakautumiseksi
tSB	Ajanhetki, jolloin alkion onkaloituminen, eli blastoseelin muodostuminen alkoi

Jokaisen alkion video analysoitiin tietämättömänä PGT-A tuloksesta, koska aneuploidian paljastuminen olisi saattanut vaikuttaa tulkintaan. Alkionkehitys on esiteltynä aikajanalla kuvassa 5. Aikajanalla olevien laatikoiden numerot kertovat solujen lukumäärän kyseisellä hetkellä. Numeroiden alla on lisäksi esitettyä lyhenteet kyseisellä ajanhetkellä tutkituista parametreista. Aikajaksoa kuvaavat parametrit (s_1 ja s_2) on merkitty nuolin ja selitetty kuvan alla.



$$s_1 = t_4 - t_3$$

$$s_2 = t_{SB} - \text{Pnfade}$$

Kuva 5 TL-analyyssissä tarkasteltujen parametrien määritelmät ja niiden esiintymisen ajankohdat

2.5 PGT-A

Viidentenä tai kuudentena päivänä alkiot oli siirretty pois embryoskoopista biopsointia ja aneuploidian tutkimusta (PGT-A) varten. Kustakin alkioista biopsoitiin noin 5-8 trofektodermin solua, jotka lähetettiin testilaboratorioon analysoitavaksi. Alkiot säilytettiin nestetyössä (-196°C) odottamassa tutkimustuloksien varmentumista.

Alkioiden aneuploidiatestaus tutkittiin uuden sukupolven sekvensointimenetelmää (NGS = Next Generation Sequencing) hyödyntäen. Aiemmin yleisesti käytettynä PGT-A menetelmänä on toiminut FISH (Fluorescence in situ hybridization). Menetelmänä FISH on kuitenkin rajallinen, sillä sen avulla pystytään tutkimaan aneuploidisuutta ainoastaan muutamien, korkeintaan noin 10 kromosomin kohdalla. Esimerkiksi Rubio ym. 2003 tutkivat aneuploidiaa FISH menetelmällä kromosomeista 13,16,18,21,22, X ja Y. Samaisessa tutkimuksessa todettiin useiden eri tutkimuksien tavoin, että aneuploidia olisi syytä tutkia jatkossa kaikkien 24 kromosomin kohdalla.

Menetelmät, kuten vertaileva genomisen hybridisaatio (aCGH= array comparative genome hybridization) ja NGS, mahdollistavat kaikkien kromosomien yhtäaikaisen tutkimisen ja tarjoavat luotettavia, tarkkoja ja spesifejä PGT-A tuloksia (Fiorentino ym. 2014). Fiorentino ym 2014 tutkimuksessa NGS tunnisti aneuploidiset alkiot 99,98% spesifisyydellä ja 100% sensitiivisyydellä. Tutkimuksessa osoitettiin lisäksi NGS:n kyvykyys havaita jopa alle 14kB segmentaaliset epätasapainot. Tästä syystä NGS tarjoaa huomattavasti paremman PGT-A resoluution kuin aCGH. Tuloksien perusteella NGS voidaan täten pitää lujatekoisena menetelmänä, jonka avulla alkionvalintaa voidaan tehdä entistä johdonmukaisemmin ja tarkemmin (Fiorentino ym. 2014).

PGT-A tulosten perusteella alkiot jaettiin kahteen kategoriaan; aneuploideihin ja euploideihin. Aneuploideihin lukeutui lisäksi kolme alaryhmää; mosaiikkiset-, segmentaaliset-, sekä kaoottiset alkiot. Mosaiikit muodostuvat hedelmöityksen jälkeisissä tapahtumissa ja koostuvat useammasta, joko aneuploideja, tai euploideja soluja sisältävistä solulinjasta. Segmentaalisisissa alkioissa on viimeistään hedelmöityksen yhteydessä tapahtunut kromosomiosien deleetioita tai duplikaatiota. Kaoottisten alkioiden kohdalla PGT-A tulosta ei onnistuttu saamaan joko biopsian riittämättömyyden tai NGS-menetelmässä tapahtuneiden DNA-fragmenttien vahvistamisessa tapahtuneiden häiriöiden takia. Koska niiden aneuploidisuus ei ollut todistettavissa, jätettiin ne tuloksien tarkastelun ulkopuolelle.

3. TULOKSET

Analysoiduista 282 alkiovideosta PGT-A tulos saatiin 274 tallenteesta. Tästä vähennettiin vielä kaksi triploidiseksi varmennettua alkioita, jolloin kokonaismääräksi saatiin 272. Munasolujen keski-ikä keräyshetkellä oli $38,2 \pm 4,2$ vuotta. Euploidisuus- ja aneuploidisuusasteet olivat 30,5% ja 64,5% (83/272, 189/272) ja ne on esitetty Taulukossa 2. Aneuploidien alaryhmiin lukeutuvia mosaiikkialkioita oli yhteensä 10 ja segmenttaalisia 3. Yhteensä 43 tehdystä alkionsirroista jatkuvia raskauksia oli 23. Jäljelle jääneiden 20 kohdalla raskaustesti oli joko 1) negatiivinen tai 2) positiivinen, mutta ultraäänikuvauksessa tulos oli negatiivinen.

Taulukko 2 PGT-A tulokset

Ominaisuudet	Arvot
Hoitokertojen määrä (kpl)	71
Munasolujen keski-ikä (vuotta)	$38,2 \pm 4,2$
PGT-A diagnosoidut alkiot (kpl)	272
Euploidisuusaste, %	30,5 (83/272)
Ikä < 40, %	48,7 (58/119)
Ikä \geq 40, %	16,3 (25/153)
Aneuploidisuusaste, %	64,5 (189/272)

3.1 Epätasaiset jakautumiset

Poikkeavissa jakautumisissa tulokset olivat analysoitavissa kaikissa 272 alkiovideossa ja ne esitetään Taulukossa 3. Poikkeavien jakautumisten esiintyvyyttä oli koko aineistossa 14,7%, euploideissa 19,3% ja aneuploideissa 12,7%. Kaikista blastokystivaiheeseen kehittyneistä alkioista ainoastaan 2,9% oli läpikäynyt epätasaisen jakautumisen yhdestä solusta suoraan kolmeen (1->3). Seuraavassa mitoottisessa jakautumisessa (2->5) poikkeamia oli 7,7% alkioista, euploideista 8,4% ja aneuploideista 7,4%. Käänteinen jakautuminen, eli reverse cleavage, esiintyi 6,6% alkioista, ollen 9,6% euploidisissa ja 4,8% aneuploidisissa.

Taulukko 3 Poikkeavien jakautumisten yleisyys euploideissa ja aneuploideissa.

	Yhteensä, (%)	1->3, (%)	2->5, (%)	RC, (%)
Poikkeavasti jakautuneet	14,7 (40/272)	2,9 (8/272)	7,7 (21/272)	6,6 (17/272)
Euploidit blastokystit	19,3 (16/83)	2,4 (2/83)	8,4 (7/83)	9,6 (8/83)
Aneuploidit blastokystit	12,7 (24/189)	3,2 (6/189)	7,4 (14/189)	4,8 (9/189)

Epätasaiset jakautumisten prosentuaaliset jakautumiset aneuploidien ja euploidien välillä. 1->3 = jakautuminen 1 solusta suoraan 3. 2->5 = jakautuminen 2 solusta suoraan 5. RC= Käänteinen jakautuminen, eli reverse cleavage. jossa kaksi juuri jakautunutta solua fuusioituvat takaisin yhteen.

3.2 Monitumaisuus epätasaisesti ja normaalisti jakautuneiden välillä

Monitumaisuus, eli multinucleation (MN), oli nähtävissä valtaosassa epätasaisesti jakautuneita alkioita. Vertailu poikkeaman yleisyydestä epätasaisesti ja tasaisesti jakautuneiden alkioiden välillä on esitettyinä Taulukossa 4. Epätasaisen ryhmästä monitumaisuus oli havaittavissa euploidisissa 81,3% (13/16) ja aneuploidisissa 75,0% (18/24). Tavallisesti jakautuneiden ryhmässä monitumaisuutta oli havaittavissa huomattavasti pienemmässä määrässä alkioita; euploideissa 49,3% (33/67) ja aneuploideissa 44,8% (74/165).

Taulukko 4 Vertailu epätasaisesti ja tasaisesti jakautuneiden, aneuploidien ja euploidien, alkioiden välillä

	Epätasaiset, (%)	Tavalliset, (%)
Euploidit blastokystit	81,3 (13/16)	49,3 (33/67)
Aneuploidit blastokystit	75,0 (18/24)	44,8 (74/165)

Monitumaisuuden (MN, Kuva 4C ja D) esiintyminen epätasaisesti jakautuneiden (1->3, 2->5, RC=reverse cleavage), sekä tavallisesti jakautuneiden aneuploidien ja euploidien ryhmässä.

Muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta monitumaisuutta esiintyi tavallisesti jakautuneissa kummankin mitoottisen jakautumisen jälkeen sekä 2-solu- että 4-soluvaiheissa (MN2, MN4). Monitumaisuutta löytyi kaikista ikäryhmistä ja sitä esiintyi usein muiden poikkeamien yhteydessä.

3.3 Esitumat (PN) ja niissä havaitut poikkeamat

Kaikista alkioista (272) esitumissa havaittavia poikkeamia pystyttiin arvioimaan 269 osalta (81 euploidia, 188 aneuploidia) ja tulokset on esitelty Taulukossa 5. Pronukleuksien poikkeava lukumäärä (PN2.1 ja PN4) havaittiin yhteensä 10 alkiossa (5 kummassakin ryhmässä). Pronukleuksien erikokoisuus (PNdiff) oli yleisin PN poikkeavuksissa havaittu parametri ja sen osuus oli yhteensä 18,2% alkioista (49/269, 18,5% euploideissa, 18,1% aneuploideissa).

Taulukko 5 Pronukleuksissa havaitut poikkeamat euploidisissa ja aneuploidisissa alkioidissa.

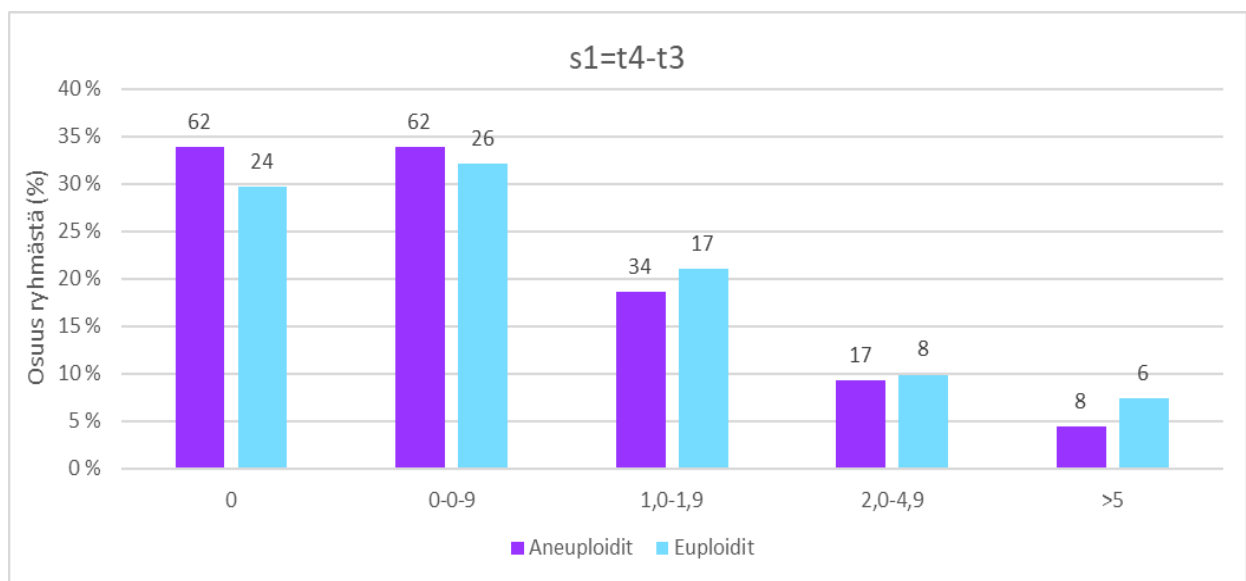
	Yhteensä, (%)	PN2.1, (%)	PN4, (%)	Pndiff, (%)
PN poikkeamia	21,9 (59/269)	2,6 (7/269)	1,1 (3/269)	18,2 (49/269)
Euploidit blastokystit	24,7 (20/81)	3,7 (3/81)	2,5 (2/81)	18,5 (15/81)
Aneuploidit blastokystit	20,7 (39/188)	2,1 (4/188)	0,5 (1/188)	18,1 (34/188)

Esitumissa esiintyneet poikkeamat euploidien ja aneuploidien ryhmissä. PN2.1 = Kahden esituman lisäksi ainakin yksi, pienempi tuma. PN4= Neljä esitumaa. PNdifff = Esitumien merkittävä kokoero. Kuva 4 A ja B

Tuloksista huomataan, että poikkeavasta esitumien lukumäärästä huolimatta hedelmöittyneen munasolun on mahdollista kehittyä euploidiseksi. Tosin prosentuaalinen osuus (3,7%) blastokystivaiheeseen kehittyneistä alkioidista on kuitenkin hyvin pieni. Koska pronukleuksien poikkeamia esiintyy miltei yhtä paljon kummassakin ryhmässä, ei niiden perusteella voida tehdä johtopäätöksiä alkion aneuploidisuudesta.

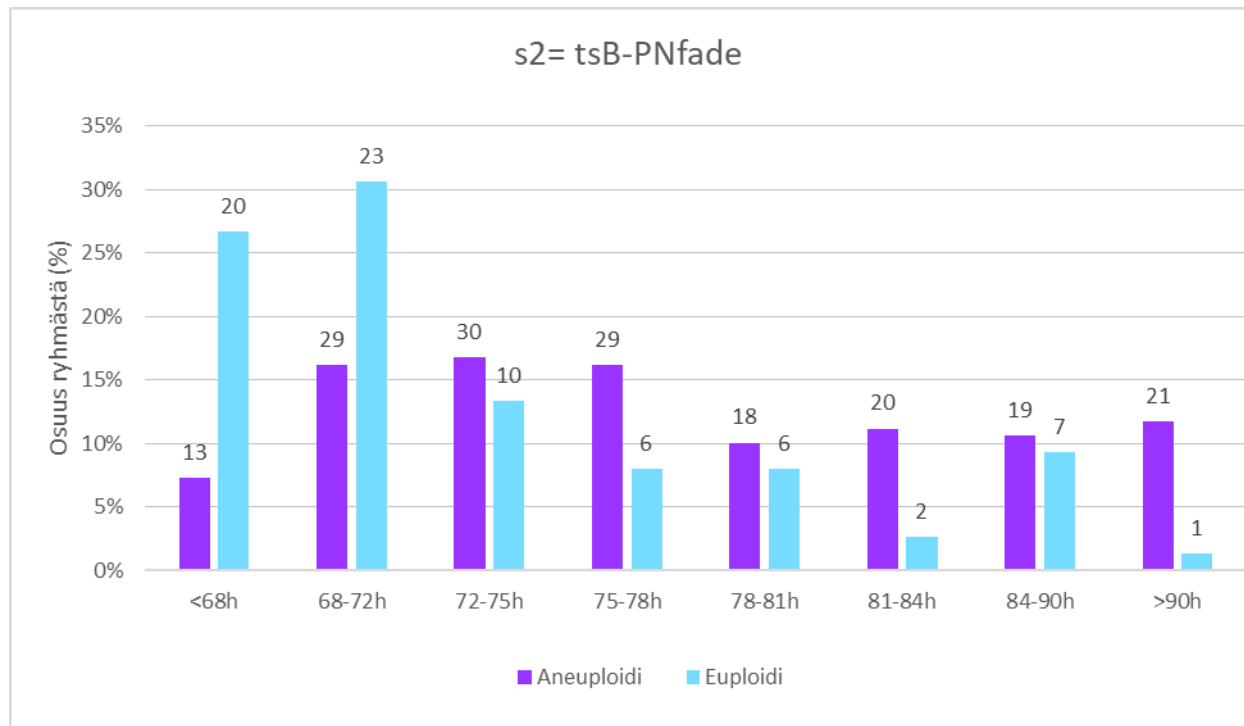
3.4 Kineettisten parametrien arviointi

Aikajaksolla s1 mitattiin 2-soluvaiheen jälkeen aikaeroa kahden blastomeerin solusyklin välillä. Tulokset on esitelty Kuvaajassa 7. Aikaero saatiin laskettua yhteensä 264/272 alkioidista. Euploideissa alkioidissa solusyklien aikaväli oli 0,0h – 17,50h (mediaani 0,60h) ja vastaavasti aneuploidien aikaväli oli 0,0h -12,70h (mediaani 0,50h). Alle tunnin solusykliiveellä jakautui 61,7% euploideista ja 68,3% aneuploideista.

**Kuvaaja 1** 2 soluvaiheesta 4-soluvaiheeseen. Blastomeerien solusyklien eriaikaisuus tunneissa (t3= 3-soluvaihe, t4= 4-soluvaihe)

Vaikka solusyklien eriaikaisuuksissa mitattiin suurta hajontaa kummassakin ryhmässä, oli viive (s1) mediaaniltaan suurempi euploidisissa alkioissa. Yli viiden tunnin (>5h) viiveitä esiintyi prosentuaalisesti hieman enemmän euploideissa, kuin aneuploideissa (7% ja 6/81 vrt. 4% ja 8/183).

Ajanjaksolla s2 mitattiin aikaväliä esitumien häviämisenä blastokystin muodostumiseen (tSB-PNfade). Aikaväli saatiin mitattua 10 minuutin tarkkuudella yhteensä 256 alkiovideosta (75 euploidia ja 179 aneuploidia) ja tulokset on esitelty Kuvaajassa 3. Kuvaajasta käy ilmi, että kehitysnopeutta kuvannut aika s2 ei ollut alkioissa normaalijakautunutta. Euploidiset alkiot osoittavat nopeampaa kehitysnopeutta 57,3% (43/75) muodostuessaan blastokysteiksi alle 72h päästä pronukleuksien häviämisenä (vrt. aneuploidit 23% ja 42/179).



Kuvaaja 2 s2 (tSB-PNfade) aikavälin jakautuminen aineistossa. Aneuploidit ja euploidit ovat jaettuna aikojen perusteella 8 ryhmään. Pylväät kuvaavat prosenttiosuuksia kuhunkin aikaryhmään asettuneista alkiosta.

Tuloksien perusteella voidaan huomata, että alkion hidas kehitysnopeus blastokystiksi voisi olla merkki aneuploidiasta. Ainoastaan yksi yli 90h ryhmään (ajalla 107,1h) kuulunut alkio oli euploidinen. Aneuploidisille alkiolle oli tyypillisempää hitaampi kehitysnopeus s2 mediaaniajan ollessa 76,8h. Vastaava mediaani oli euploideilla huomattavasti alhaisempi, vain 70,6h. Yli 80h kestäneissä s2 ajoissa euploidien ja aneuploidien prosentuaaliset osuudet olivat 33,5% ja 13,3% (60/179 ja 10/75).

4. YHTEENVETO

Tämän TL-analyysiä ja PGT-A:ta hyödyntäneen tutkimuksen perusteella voitiin tehdä joitakin merkityksellisiä johtopäätöksiä morfokinetiikan eroavaisuuksista aneuploidien ja euploidien alkoiden välillä. Ensinnäkin hitaan kehittymisnopeuden omaavat alkiot osoittautuivat hyvin usein aneuploidisiksi. Tuloksien perusteella PGT-A ei välttämättä ole perusteltua niiden alkoiden kohdalla, joissa s2 vaihe (tSB-tPNfade) on kestänyt yli 90h. Toiseksi pronukleuksissa (PN) tapahtuneet poikkeamat ja epätasaiset jakautumiset (1->3, 2->5, RC) olivat yhtä yleisiä kaikissa ikäryhmissä, eikä korrelaatiota alkoiden aneuploidisuuteen näiden parametrien osalta löytynyt. Kolmanneksi monitumaisuus oli etenkin euploideilla alkiolla hyvin yleinen ilmiö epätasaisen jakautumisen yhteydessä. Epätasaisesti jakautuneilla monitumaisuus oli merkittävästi yleisempää kummassakin ryhmässä verrattuna tavallisesti jakautuneisiin alkioihin. Havainto on ristiriidassa aiemmin (Vera-Rodriguez ym. 2015) esitetystä väitteestä, jonka mukaan poikkeamayhdistelmät johtaisivat kaikissa tapauksissa hyvin suurella todennäköisyydellä aneuploidiaan.

Suuriakin poikkeuksia läpikäyneet alkiot olisi syytä biopsoida 5.-6. päivänä, sillä ne ovat voineet kehittyä euploideiksi blastokysteiksi (Lagalla ym. 2017). Tämän tutkimuksen perusteella kuitenkin hyvin hitaiden, yli 90 tuntia kestäneiden s2-vaiheiden (tSB-PNfade) kohdalla PGT-A ei ole välttämättä tarkoituksenmukaista. Toisaalta syy hitaan kehitysnopeuden taustalla ei ole välttämättä kovin yksiselitteinen. Tässä tutkimuksessa blastokysteiksi asti kehittyneet euploidit olivat prosentuaalisesti käyneet läpi enemmän epätasaisia jakautumisia (ja siihen vahvasti liittyvää monitumaisuutta) kuin aneuploidit alkiot. Mikäli poikkeamia sisältävä, hitaasti kehittyvä alkio kasvaa blastokystiksi asti, onko se silloin elinvoimaisempi ja lopulta parempi vaihtoehto siirtoon kuin täydellisesti jakautumista koko kehitysajalta osittanut alkio? Toisaalta emme tiedä epätasaisen jakautumisen vaikutusta alkion muihin ominaisuuksiin. Esimerkiksi 1 solusta 3 soluun (1->3) jakautumisia oli ainoastaan 2,9% osuudessa, mikä oli osoitus sen harvinaisuudesta blastokysteiksi kehittyneiden alkoiden joukossa. Zhan ym 2016 huomasivat 1->3 jakautumisen läpikäyneillä alkiolla euploidisuuden merkittävää vähenemistä ja suurten kromosomaalisten poikkeamien kasvua. Tuloksien yhteydessä esitettiin mallia, jonka perusteella kaikki 1->3 jakautuneet alkiot tulisi hylätä. Hylkäys voisi olla perusteltua, mikäli potilaille olisi mahdollista taata siirtoa varten kaikissa tilanteissa vähintään 1 euploidi alkio. Toimivasta hylkäysmallista voisi olla hyötyä, sillä sen avulla pystyttäisiin optimoimaan TL-laitteiston rajallista kapasiteettia ja säästämään potilaille viljelystä ja seurannasta koituvista kustannuksista.

Tutkimuksessa ei havaittu merkittävää eroa esitumissa tapahtuvien poikkeamien yhteydestä aneuploidiaan. Esitumat toimivat tutkimuksessamme huonosti aneuploidisuuden ennustajina, mutta niillä saattaa olla suuri rooli blastokystin muodostumisessa ja alkion selviytymisen ennustajina (Desai ym. 2018). Erilaisia alkioiden selviytymisen ennustemalleja on esitelty useammassa tutkimuksessa (Campbell ym. 2013, Vera-Rodriguez ym. 2015). Yhteistä valtaosalle ennusteista on se, että hitaasti jakautuvilla alkiolla on hyvin alhaiset mahdollisuudet kehittyä blastokysteiksi (Zhan ym. 2016). Epätasaisissa jakautumisissa ulos purskahtavat fragmentit saattavat sisältää tärkeitä blastokystin muodostumiseen vaadittavia komponentteja. Niiden jääminen kompaktoinnin ulkopuolelle saattaa tehdä blastokystimuodostuksesta mahdottoman ja johtaa solujen apoptoosiin. Geeniekspressioiden soveltaminen alkiodiagnostiikassa tarjoaisi vaihtoehtoisen ratkaisun PGT-A:lle (Vera-Rodriguez ym. 2015). Optimaalisessa tilanteessa siirtoon valittaisiin blastokysti, joka olisi saanut parhaat pisteet TL-analyysissä nähtävien morfokineettisten parametrien sekä niiden painotuskertoimien kautta luodussa algoritmissä.

Suurin osa morfokineettisistä poikkeamista tapahtunee alkioidissa, jotka epäonnistuvat kehittymään blastokysteiksi asti. Tutkittujen poikkeamien prosentuaaliset osuudet aineistossa olivat alhaisia, sillä morfokinetiikan analysointia tehtiin ainoastaan blastokystivaiheeseen kehittyneiden alkioiden osalta. Mikäli poikkeamien yleisyyttä haluttaisiin tutkia jatkossa enemmän, tulisi niitä tutkia kaikkien hedelmöitettyjen munasolujen kohdalla välittämättä siitä, kehittyvätkö ne blastokysteiksi vai eivät. Laajemman aineiston avulla olisi mahdollista tutkia tilastollista merkitsevyyttä poikkeamien ja alkion aneuploidisuuden välillä. Tilastollista dataa saataisiin jatkossa myös tämän tutkimuksen perusteella, sillä tuloksissa esille nousseiden parametrien kohdalla ei tässä tehty minkäänlaista tilastollista analyysiä. Poikkeamia nousi esiin ryhmissä, jotka suuren lukumääränsä ansiosta (s1 264kpl ja s2 254 kpl) olisivat mahdollistaneet tilastollisen analyysin. Tutkimus ei lisäksi ottanut mitään kantaa yhteyksistä poikkeamien ja onnistuneiden raskaustuloksien (jatkuva raskaus ja synnytys) välillä. Seuraavissa tutkimuksissa poikkeamien tilastollista merkitsevyyttä voitaisiin analysoida ja kehityksen aikaikkunaa laajentamalla tarkastella myös alkuvaiheen morfokinetiikan merkitystä raskaustuloksiin.

5. LÄHTEET

- Campbell A., Fishel S., Bowman N., Duffy S., Sedler M. & Hickman C.F.L. (2013) Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reproductive BioMedicine Online* **26**(5), 477-485.
- Desai N., Goldberg J.M., Austin C. & Falcone T. (2018) Are cleavage anomalies, multinucleation, or specific cell cycle kinetics observed with time-lapse imaging predictive of embryo developmental capacity or ploidy? *Fertility and Sterility* **109**(4), 665-674.
- Fiorentino F., Bono S., Biricik A., Nuccitelli A., Cotroneo E., Cottone G., Kokocinski F., Michel C., Minasi M.G. & Greco E. (2014) Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Human Reproduction* **29**(12), 2802-2813.
- Lagalla C., Tarozzi N., Sciajno R., Wells D., Di Santo M., Nadalini M., Distratis V. & Borini A. (2017) Embryos with morphokinetic abnormalities may develop into euploid blastocysts. *Reproductive BioMedicine Online* **34**(2), 137-146.
- Minasi M.G., Colasante A., Riccio T., Ruberti A., Casciani V., Scarselli F., Spinella F., Fiorentino F., Varicchio M.T. & Greco E. (2016) Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: a consecutive case series study. *Human Reproduction (Oxford, England)* **31**(10), 2245-2254.
- Penzias A., Bendikson K., Butts S., Coutifaris C., Falcone T., Fossom G., Gitlin S., Gracia C., Hansen K., La Barbera A., Mersereau J., Odem R., Paulson R., Pfeifer S., Pisarska M., Rebar R., Reindollar R., Rosen M., Sandlow J., Vernon M. & Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted, Reproductive Technology. (2018) The use of preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): a committee opinion. *Fertility and Sterility* **109**(3), 429-436.
- Piccolomini M.M., Nicolielo M., Bonetti T.C.S., Motta E.L.A., Serafini P.C. & Alegretti J.R. (2016) Does slow embryo development predict a high aneuploidy rate on trophectoderm biopsy? *Reproductive BioMedicine Online* **33**(3), 398-403.
- Rubio C., Simn C., Vidal F., Rodrigo L., Pehlivan T., Remoh J. & Pellicer A. (2003) Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Human Reproduction* **18**(1), 182-188.
- Vajta G., Korösi T., Du Y., Nakata K., Ieda S., Kuwayama M. & Nagy Z.P. (2008) The Well-of-the-Well system: an efficient approach to improve embryo development. *Reproductive BioMedicine Online* **17**(1), 73-81.
- Vera-Rodriguez M., Chavez S.L., Rubio C., Reijo Pera R.A. & Simon C. (2015) Prediction model for aneuploidy in early human embryo development revealed by single-cell analysis. *Nature Communications* **6**(1), 7601.
- Zhan Q., Ye Z., Clarke R., Rosenwaks Z., Zaninovic N. & Schlatt S. (2016) Direct Unequal Cleavages: Embryo Developmental Competence, Genetic Constitution and Clinical Outcome. *PLoS ONE* **11**(12), e0166398.