

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytiikka

Solu- ja molekyylibiologia

2012

Riina Tiikasalo

BLASTOMEERIEN MÄÄRÄN JA JAKAUTUMISNOPEUDEN MERKITYS ALKION IMPLANTAATIOON PAKASTETUN ALKION SIIRROISSA



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Riina Tiikasalo

BLASTOMEERIEN MÄÄRÄN JA JAKAUTUMISNOPEUDEN MERKITYS ALKION IMPLANTAATIOON PAKASTETUN ALKION SIIRROISSA

Alkion siirrossa normaalisti yksi tai korkeintaan kaksi laboratorio-olosuhteissa kasvatettua alkioita viedään pehmeään, ohuen katetrin avulla kohtuun. Muut hyvänlaatuiset laboratorioissa kasvatetut alkioita voidaan pakastaa mahdollista myöhempää käyttöä varten. IVF (In Vitro Fertilization) –laboratorioissa bioanalytiikan keskeisiin työtehtäviin kuuluu alkioiden valinta, ja näin ollen IVF-laboratorioissa työskentelevältä edellytetään siirrettävän alkion valintaperusteiden tuntemista. Myös hoidon tavoitellun lopputuloksen, eli yhden terveen lapsen syntymän, kannalta on oleellista, että siirrettäväksi valikoidaan yksi mahdollisimman suurella todennäköisyydellä kohdun seinämään kiinnittyvä alkio.

Opinnäytetyön tarkoituksena on tutkia IVF (In Vitro Fertilization) ja ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection) –menetelmien avulla hedelmöitettyjen alkioiden blastomeerien määrän ja jakautumisnopeuden merkitystä alkion implantaatioon pakastetun alkion siirroissa.

Aineisto koostui Turun Yliopistollisen Keskussairaalan IVF-laboratorioissa kaikista vuoden 2007 alusta vuoden 2011 loppuun mennessä suoritetuista pakastetun alkion siirroista, jotka täyttivät tässä opinnäytetyössä esitetyt kriteerit. Alkioita oli lopullisessa aineistossa yhteensä 745 kappaletta. Alkiot jaettiin ryhmiin sen mukaan, millainen niiden solumäärä oli ollut kaksi päivää, sekä kolme päivää hedelmöitymisen jälkeen. Kunkin ryhmän implantaatioasteet esitettiin taulukoituna sekä määrällisesti että prosentteina.

Tämän tutkimuksen perusteella voidaan todeta, että blastomeerien määrällä ja jakautumisnopeudella on merkitystä alkion implantaatioon. Määrällisesti eniten kliinisiä raskauksia tuottivat sellaiset alkioita, jotka toisena päivänä olivat olleet 4-soluisia ja kolmantena 8- tai 9-soluisia. Toinen implantaatioon positiivisesti vaikuttanut tekijä todettiin olevan parillisuus solumäärän kasvamisessa, sekä yllättäen myös niin sanottujen pysähtyneiden sekä nopeasti jakautuvien alkioiden suhteellisen hyvä implantaatioaste.

ASIASANAT:

Alkio, alkionsiirto, pakastetun alkion siirto, alkion valinta, blastomeeri, alkion implantaatio, jakautumisnopeus, koeputkihedelmöitys.

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree programme in Biomedical Laboratory Science| Cell- and Molecular Biology

December 2012 | 34

Harri Mankonen, Mika Venojärvi

Riina Tiikasalo

THE INFLUENCE OF CLEAVAGE RATE AND BLASTOMERE NUMBER ON EMBRYO IMPLANTATION IN FROZEN EMBRYO TRANSFERS

Normally, in embryo transfers, one or a maximum of two embryos are transferred to the patient's uterus through a thin, flexible catheter. Other embryos of good quality can be frozen for later use. In an IVF (In Vitro Fertilization) laboratory, one of the most important tasks of a biomedical laboratory scientist is to select an embryo for transfer, and therefore to recognize the features of a good quality embryo. Also, to achieve the outcome of the treatment, which is for the patient to give birth to one healthy child, it is essential, that an embryo, which has the highest implantation potential, will be selected for transfer.

The goal of this bachelor's thesis is to find out, how the cleavage rate and blastomere number of embryos, that were fertilized using both the ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection) and the IVF procedure, affect implantation rate.

The material of this thesis consisted of all the frozen embryo transfers, that were carried out in the IVF laboratory of Turku University Hospital between 2007 and 2011, and that fitted all the criteria presented in this thesis. The final material consisted of 745 embryos. The embryos were divided into groups, based on the cell number of the embryos on day 2 and on day 3. The implantation rates of each group were presented in a table chart, both in percentages and in numbers.

Based on the results of this research, it can be said that cleavage rate and blastomere number does influence embryo implantation. Embryos that had 4 blastomeres on day 2 and 8 to 9 blastomeres on day 3 produced the most clinical pregnancies. Another factor that seemed to have a positive effect on implantation was the increase of an even number of cells in cleavage from day 2 to day 3. Another matter worth noticing was the fairly good implantation rate of the embryos that had stopped developing, and also of the ones that had a very fast cleavage rate.

KEYWORDS:

Embryo, embryo transfer, frozen embryo transfer, embryo selection, blastomere, embryo implantation, implantation rate, in vitro fertilization.

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO	6
1 JOHDANTO	7
2 OPINNÄYTETYÖN TEOREETTISET LÄHTÖKOHDAT	9
1.1 Opinnäytetyön keskeiset käsitteet	9
1.1.1 Alkio	9
1.1.2 Alkion siirto	11
1.1.3 Alkion valinta	12
1.2 Aiempia tutkimuksia aiheesta	14
3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT	17
4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS	18
4.1 Tutkimusaineiston käsittely	18
4.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat	20
4.3 Opinnäytetyön eettisten näkökohtien tarkastelu	21
5 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	22
6 POHDINTA	29
6.1 Tutkimustulosten pohdinta	29
6.2 Tutkimuksen luotettavuus	30
6.3 Jatkotutkimusaiheet	31
LÄHTEET	32

KUVIOT

Kuvio 1. Implantaatioaste alkion toisena päivänä lasketun solumäärän mukaan	27
Kuvio 2. Implantaatioaste alkion kolmantena päivänä lasketun solumäärän mukaan	28

TAULUKOT

Taulukko 1. Alkioiden implantaatioaste	22
Taulukko 2. Alkioiden siirrot	22
Taulukko 3. Potilaiden ikä	23
Taulukko 4. Alkiot ryhmiteltynä blastomeerien määrän mukaan	24

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

blastomeeri	Hedelmöittyneen munasolun jakautumisesta syntynyt varhaisalkion solu. (Dale & Elder 2000, 66.)
eSET	<i>Elective Single Embryo Transfer</i> , elektiivinen yhden alkion siirto, jossa siirrettävä alkio valitaan usemman pakastuskelpoisen alkion joukosta. (van Montfoort ym. 2005, 433.)
FET	<i>Frozen Embryo Transfer</i> , pakastetun alkion siirto, jossa aiemmin pakastettu alkio sulatetaan ja siirretään kohtuun. (Klemetti 2006, 12 ja 19.)
fragmentti	Blastomeerin jakautumisen yhteydessä syntynyt tumaton solunulkoinen kappale. (Hnida ym. 2004, 288.)
ICSI	<i>Intracytoplasmic Sperm Injection</i> . Keinohedelmöityksen muoto, jossa munasolu hedelmöitetään injektoimalla yksittäinen siittiö sen sisään. (Klemetti 2006, 12 ja 19.)
implantaatio	Tapahtumasarja, jossa alkio kiinnittyy kohdun seinämään. (Sariola ym. 2006, 28.)
IVF	<i>In Vitro Fertilization</i> , koeputkihedelmöitys. Keinohedelmöityksen muoto, jossa munasolut kerätään naisen kehosta ja hedelmöitetään siittiöillä laboratoriossa. (Klemetti 2006, 12 ja 19.)
komp	Alkion kompaktoituminen. Alkionkehityksen vaihe, jossa sen blastomeerien muoto ja liitokset muuttuvat. Kompaktoitumisvaiheessa solurajojen havainnointi on vaikeaa. (Mankonen 2012)
2pn	Normaalisti hedelmöittyneessä munasolussa on nähtävissä kaksi tumaa (<i>pronucleus</i>) hedelmöitystä seuraavan vuorokauden aikana. Ennen ensimmäistä solunjakautumista tässä vaiheessa olevaa munasolua kutsutaan tsygootiksi. (Sastry & Shukal 2010, 89-97.)
tsygootti	Hedelmöittynyt munasolu. Alkionkehityksen ensimmäinen vaihe. (Sariola ym. 2006, 22-32.)

1 JOHDANTO

Tämän opinnäytetyön aihe keskittyy yhteen IVF-laboratorion tärkeimpään tehtävään, eli alkion valintaan raskauden aikaansaamiseksi. Lyhenne IVF tulee sanoista *in vitro fertilization* ja tarkoittaa koeputkihedelmöitystä, jossa kypsyneet munasolut kerätään ja hedelmöitetään naisen kehon ulkopuolella laboratoriossa, minkä jälkeen ne kasvatetaan alkioiksi ja siirretään naisen kohtuun. Tutkimus on luonteeltaan solubiologinen.

IVF-laboratoriossa bioanalyytikon keskeisimpiin työtehtäviin kuuluu alkioden luokittelu sekä kohtuun siirrettävän alkion valinta. Myös potilaan ja hoidon tavoitellun lopputuloksen, eli yhden terveen lapsen syntymään johtavan raskauden, kannalta on oleellista, että siirrettäväksi valikoidaan mahdollisimman suurella todennäköisyydellä kohdun seinämään kiinnittyvä alkio.

Avustettu lisääntymisteknologia on viime vuosien aikana ollut lääketieteellisen teknologian merkittävimpiä ja tärkeimpiä osa-alueita, sillä lapsen syntymällä on pitkällisiä vaikutuksia paitsi yksilön ja perheen hyvinvointiin, tätä kautta myös yhteiskunnalle. (Dale & Elder 2000, 109.) Koeputkihedelmöityshoitojen määrä Suomessa lisääntyy vuosi vuodelta, ja erityisesti pakastetun alkion siirrot kasvattavat merkitystään (Gissler & Heino 2011). Hyvin toimiva alkionpakastus tekee mahdolliseksi yhden alkion siirrot, sillä muut käyttökelpoiset alkiot voidaan pakastaa myöhempää käyttöä varten. Yhden alkion siirroilla pyritään välttämään IVF:n suurin riskitekijä, eli kaksosraskaus. (Mankonen 2012; Kawachiya ym. 2011, 2140.) Viimeisen kymmenen vuoden aikana on koeputkihedelmöityshoitojen määrä kasvanut Suomessa noin 19 prosenttia, missä tärkeänä tekijänä on pakastetun alkion siirtojen määrän voimakas lisääntyminen. Vuonna 2010 Suomessa tehtiin yhteensä 3322 potilaan omilla sukusoluilla tehtyä pakastetun alkion siirtoa, kun vastaava luku vuonna 2005 oli 2960 ja vuonna 1995 vain 1242. Pakastetun alkion siirrot ovat siis lisääntyneet vuodesta 1995 lähes 40 prosenttia vuoteen 2010 mennessä. Vuonna 1992

kyseisiä siirtoja tehtiin Suomessa 176, mikä on vain noin viisi prosenttia nykyisestä. (Gissler & Heino 2011.)

Koko ala on paitsi Suomessa, myös maailmalla verrattain nuori tieteenala, sillä maailman ensimmäinen niin sanottu koeputkilapsi syntyi vuonna 1978. Tämä herätti myös Suomen gynekologeissa toiveita lapsettomuudesta kärsivien pariskuntien paremmasta auttamisesta ja alan tutkimustyö alkoi tämän jälkeen myös Suomessa. Suomen ensimmäinen koeputkihedelmöityksellä alkuun saatettu lapsi syntyi vuonna 1984. (Koskimies 2004, 7-12.)

Alan uusinta teknologiaa edustaa Time-lapse-kuvaseuranta, joka mahdollistaa alkion kehityksen seuraamisen laboratorio-olosuhteissa videolta ilman, että alkiota joudutaan ottamaan pois viljelykaapista. Time-lapse-kuvaseuranta antaa aiempaa laajemmin tietoa alkion kehityksestä, esimerkiksi solujen synkronisesta tai asynkronisesta jakautumisesta, ja se on mahdollistanut entistä paremmin niin sanottujen hyvänlaatuisten alkioiden kehitykseen yhdistettävien piirteiden tutkimisen. Time-lapse-kuvaseurantaan käytettävien embryoskooppien korkeasta hinnasta johtuen kuvaseuranta on kuitenkin käytössä vain harvassa IVF-laboratoriossa. (Lemmen ym. 2008, 385-386; Mankonen 2012.)

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, miten alkion blastomeerien määrä ja jakautumisnopeus vaikuttavat alkion implantaatioon eli kiinnittymiseen, ja näin ollen johtavat raskauteen. Toisin sanoen tarkoituksena on laatia arvio siitä, minkälaiset prosentuaaliset mahdollisuudet minkäkinlaisella alkiolla on implantoitumiseen. Tavoitteena on työn tulosten avulla helpottaa laboratorion henkilökuntaa alkion valinnassa tulevilla ongelmatilanteilla.

2 OPINNÄYTETYÖN TEORETTISET LÄHTÖKOHDAT

1.1 Opinnäytetyön keskeiset käsitteet

1.1.1 Alkio

Alkiolla tarkoitetaan yksilön ensimmäisiä kehitysvaiheita, jotka kestävät ihmisellä aina munasolun hedelmöitymisestä noin kahdeksan viikon ikään asti. Alkion kehitysvaiheet voidaan jaotella blastogeneesiin, joka päättyy 4. viikolla, sekä organogeneesiin, joka kestää tästä eteenpäin aina 9. viikolle, jolloin alkio on kehittynyt edelleen sikiöksi. Organogeneesin aikana tapahtuu valtaosa eri elimien kehittymisestä. (Sariola ym. 2006, 154, 296.)

1.1.1.1 Alkion kehityksen alkuvaiheet

Alkion kehitys alkaa, kun munasolu ja siittiö yhdistyvät ja munasolu hedelmöittyy. Hedelmöittynyttä munasolua kutsutaan tsygootiksi. Hedelmöitymisen jälkeen munasolun ensimmäinen solunjakautuminen käynnistyy ja seurauksena on kaksisoluinen alkio. Ensimmäisinä päivinä solunjakautumiset tapahtuvat nopeasti ja alkion solumäärä lisääntyy, mutta sen koko ei kasva. Tällöin alkio kehittyy zona pellucidan, eli munasolua ympäröivän glykoproteiinivaipan, sisällä. Ensimmäisen viikon jälkeen alkio kuoriutuu zona pellucidasta kiinnittyäkseen kohdun seinämään. (Sariola ym. 2006, 22-32.) Munasolu itsessään pitää sisällään kaikki tarvittavat rakennusaineet, jotta alkio kykenee kehittymään ja solut jakautumaan ensimmäisten päivien ajan. (Gardner ym. 2004, 62-63.) Alkiota kutsutaan 2-3 –päiväisenä varhaisalkioksi, 4-päiväisenä morulaksi ja 5-6 –päiväisenä blastokystiksi (Mankonen 2012).

1.1.1.2 Implantaatio

Alkion implantaatiolla tarkoitetaan tapahtumasarjaa, jossa alkio kiinnittyy kohtuun. Implantaatio tapahtuu ihmisalkiolla 6.-9. päivänä hedelmöitymisestä, jolloin alkio kuoriutuu ulos sitä ympäröivästä zona pellucidasta ja hautautuu

kohdun seinämään. Implantaatio aiheuttaa kohdun seinämän verisuonitusten tihenemisen ja kohdun seinämästä alkaa erittyä alkioille ravinto- ja rakennusaineita. Kaikki alkioit eivät kiinnity kohdun seinämään, vaan normaalisti ainoastaan 40% alkioista kykenee implantoitumaan. (Sariola ym. 2006, 28-30.) Alkio voi virheellisesti implantoitua myös kohdun ulkopuolelle, jolloin kyseessä on kohdun ulkoinen eli ekstrauteriininen raskaus (Niemi & Väänänen 1993, 14).

1.1.1.3 Blastomeeri

Hedelmöittynyt munasolu jakautuu mitoottisesti, ja jakautumisesta syntyneitä soluja kutsutaan blastomeereiksi. Normaalisti blastomeerien jakautuminen on alkuvaiheessa synkronista, mutta myöhemmissä vaiheissa blastomeerit muodostavat ryhmiä tai kerroksia, joilla on kullekin ryhmälle tai kerrokselle ominainen jakautumisnopeus. (Dale & Elder 2000, 66.) 8-soluvaiheeseen asti alkion blastomeerit ovat totipotenteja, eli kaikilla blastomeereilla on mahdollisuus erikoistua miksi tahansa alkion kudostyypiksi (Weima 1996, 168). Totipotentti, eli kaikkikykyinen blastomeeri sisältää kaikki kokonaisen yksilön syntymiseen tarvittavat tiedot (Sariola 2006, 40).

Jakautumisvaiheessa olevasta alkion blastomeerista syntyneet uudet blastomeerit ovat kooltaan noin puolet alkuperäisen blastomeerin koosta (Dale & Elder 2000, 66). Ensimmäisten jakautumisvaiheiden aikana alkio ei ole metabolisesti yhtä aktiivinen kuin useimmat muut ihmisen solut, mikä on todennäköisesti syynä siihen, että alkion blastomeerit kykenevät jakautumaan myös *in vitro* (Dale & Elder 2000, 70). Muista normaaleista terveistä soluista poiketen alkion blastomeerit eivät tarvitse signaalimolekyylejä jakautumisen alkamiseen. (Weima 1996, 169.)

1.1.1.4 Jakautumisnopeus

Jakautumisnopeudella tarkoitetaan sitä, miten nopeasti solu jakautuu edelleen kahdeksi tytärsoluksi. Kahden peräkkäisen solunjakautumisen välinen aika toimii mittarina solun jakautumisnopeudelle. (Arora 2009, 134.) Toisin sanoen alkion blastomeerien määrän lisääntyminen yhden vuorokauden aikana kertoo

niiden jakautumisnopeudesta. Lukuisat tutkimukset ovat osoittaneet, että jakautumisnopeudella on selvä yhteys alkion laatuun eli näin ollen myös raskauden todennäköisyyteen (Bos-Mikich 2001, 2658). Yleisesti uskotaan, että parhaiten raskauden tuottaa alkio, jossa on toisena päivänä havaittavissa neljä ja kolmantena päivänä kahdeksan blastomeeria (Seli 2011, 131).

1.1.2 Alkion siirto

Alkion siirrossa normaalisti yksi tai korkeintaan kaksi laboratorio-olosuhteissa kasvatettua alkiota viedään pehmeän, ohuen katetrin avulla kohtuun. Muut hyvänlaatuiset laboratorioissa kasvatetut alkiot voidaan pakastaa mahdollista myöhempää käyttöä varten. (MSD 2011, 23-25.)

Normaaleissa olosuhteissa alkio saavuttaa kohdun neljä tai viisi päivää ovulaation jälkeen, jolloin alkio koostuu noin 60 solusta. Jo koeputkihedelmöityksen alkuvuosien aikana tehtiin paljon tutkimusta siitä, mikä olisi optimaalisin aika luokitella ja siirtää alkio. IVF-hoitojen alkuaikoina raskauksia ei kuitenkaan syntynyt niistä alkioista, joita oli kasvatettu laboratorio-olosuhteissa 5-päiväisiksi. Nykyään alkioita voidaan siirtää 1-5 päivän ikäisinä, mutta parhaasta siirtoajankohdasta tehdään edelleen runsaasti tutkimusta. (Lens & Rijnders 1996, 196-197; Pantos ym. 2008, 573-577.)

Mikäli siirto kohtuun suoritetaan seuraavana päivänä munasolun hedelmöityksestä, ei alkio ole vielä kehittynyt tsygootti-vaihetta pidemmälle. Tällöin on hyvin vaikea määrittää siirtoon valittava tsygootti, sillä yksi vuorokausi hedelmöityksen jälkeen ei voida vielä sanoa, mistä tsygootista kehittyy morfologialtaan hyvä alkio. Etuna puolestaan on se, että hedelmöitetty munasolu kasvaa laboratorio-olosuhteissa mahdollisimman lyhyen aikaa, ja palautetaan sen luonnolliseen kasvuympäristöön mahdollisimman nopeasti. Viime vuosina on tehty runsaasti tutkimusta tsygoottien morfologian vaikutuksesta raskauden todennäköisyyteen, ja tutkimustuloksia on voitu käyttää apuna siirtoalkion valinnassa. (Lens & Rijnders 1996, 197; Payne ym. 2005, 900-909; Senn ym. 2006, 234-238, Bar-Yoseph ym. 2011, 1624-1628.)

36-48 tuntia hedelmöittämisen jälkeen 2-päiväinen alkio on yleensä 2- tai 4-soluinen, mutta toisena päivänä voidaan havaita myös 5-8-soluisia alkioita, joskus jopa vielä suurempia solumääriä. Siirrettäessä 2-päiväisiä alkioita etuna on tsygoottien tavoin vähäinen laboratorio-olosuhteissa pidetty aika. Alkiot, joita on kasvatettu laboratoriossa 3-päivisiksi, ovat normaalisti 6-8-soluisia, mutta havaittavissa voi olla myös 10-12-soluisia alkioita. 3-päiväisistä alkiosta on 2-päiväisiä helpommin valittavissa solumäärältään parhaat alkiot. Fragmenttien, eli solun ulkopuolisten kappaleiden, määrä puolestaan voi tässä vaiheessa häiritä alkion tarkastelua. Normaalisti siirtoon valitaan suurimassa osassa IVF-laboratorioita 2- tai 3-päiväinen alkio. (Lens & Rijnders 1996, 198; Desai ym. 2000, 2190.)

Neljäntenä tai viidentenä päivänä hedelmöityksestä normaalisti kehittyvä alkio saavuttaa ns. morula- tai blastokystivaiheen, jolloin soluja on alkiossa jo kymmeniä (Lens & Rijnders 1996, 199). Viime vuosien tutkimukset ovat osoittaneet, että 4-päiväisinä siirretyt alkiot tuottavat erittäin hyvin kliinisiä raskauksia (Pantos ym. 2008, 573-577).

Kysymys siitä, mikä on paras hetki siirtää alkio kohtuun, aiheuttaa edelleen ristiriitaa tutkijoiden kesken. Vanhempien tutkimusten mukaan morula- ja blastokystivaiheessa siirretyt alkiot eivät tuota parempia tuloksia kuin 2- tai 3-päiväisinä siirretyt alkiot. Uudemmat tutkimukset ovat kuitenkin osoittaneet, että blastokystivaiheessa siirretyt alkiot tuottaisivat huomattavasti enemmän raskauksia, kuin varhaisemmassa vaiheessa siirretyt alkiot, erityisesti silloin, kun blastokystiksi kehittynyt alkio on kolmantena päivänä ollut 8-soluinen. (Lens & Rijnders 1996, 199; Ding ym. 2004, 203-210; Veeck ym. 2004, 1418-1425; Seli 2011, 132.)

1.1.3 Alkion valinta

Koeputkihedelmöityshoidon välitavoitteena on, että munasolujen hedelmöittymisen ja blastomeerien jakautumisen jälkeen käytettävissä olisi useita alkioita, joista yksi tai kaksi parasta voidaan valita siirrettäväksi kohtuun ja muut hyvin kehittyneet alkiot voidaan pakastaa nestetyyppisäiliöihin

myöhempää käyttöä varten. (MSD 2011, 22.) Kun useamman hyvän alkion joukosta valitaan yksi alkio siirtoa varten, kutsutaan tätä elektiiviseksi yhden alkion siirroksi, ja siitä käytetään lyhennettä eSET. (van Montfoort ym. 2005, 433.) Pakastetun alkion siirrosta käytetään lyhennettä FET (*Frozen Embryo Transfer*) (Klemetti 2006, 19).

Mikäli alkioita on useampia, siirtoon valitaan mahdollisimman hyvä alkio. Valinta tehdään yleensä blastomeerien määrän ohella alkion morfologian eli ulkonäön perusteella. Morfologia antaa alkion kehityskyvystä kuitenkin vain osittaisen kuvan, sillä kromosomipoikkeavuudet eivät yleensä vaikuta varhaisalkion morfologiaan. Hyvälaatuinen alkio on opittu tunnistamaan hoitojen tulosten sekä kerätyn tiedon perusteella, ja valintamenetelmiä tutkitaan ja kehitetään jatkuvasti. (Hnida ym. 2004, 288-293; Väestöliitto 2012a, Mankonen 2012.)

Laboratoriossa hedelmöitettyä munasolua tulee tarkastella ensimmäisen kerran noin 18 tuntia hedelmöittämisen jälkeen, jolloin normaalisti hedelmöittyneessä munasolussa on nähtävillä kaksi tumaa. Jos hedelmöittyneessä munasolussa nähdään enemmän kuin kaksi tumaa, ei siitä kehittyvää alkioita milloinkaan tule valita siirtoon. Tällaiset alkioit eivät yleensä tuota normaalia raskautta. (Pieters & Dumoulin 1999, 207.)

Joskus sytoplasman ja tuman jakautuminen, eli sytokineesi ja karyokineesi, tapahtuvat asynkronisesti, jolloin jakautumisesta syntyneissä blastomeereissa saattaa olla useampia tumia tai solut voivat olla kokonaan tumattomia. Tumattomien solujen jakautuessa syntyy fragmentteja, joiden määrä otetaan huomioon alkion valinnassa. Alkio, jonka blastomeerien kromosomit ovat epätasaisesti jakautuneet, ei kehity normaalisti. Useiden tutkimusten mukaan tällainen alkio implantoituu normaalisti jakautunutta alkioita selvästi huonommin. (Weima 1996, 171; Van Royen ym. 2003, 1062-1069.)

Kahden vuorokauden kuluttua hedelmöityksestä alkio sisältää normaalisti kaksi tai neljä solua, eli blastomeeria, ja alkion morfologiaa voidaan arvioida semikvalitatiivisesti. Blastomeerien muotoa sekä fragmentaation, eli alkion solujen ulkopuolisten kappaleiden, määrää voidaan arvioida monin eri tavoin,

mutta useimmiten käytössä on asteikko yhdestä neljään. (Lens & Rijnders 1996, 180-181; Baczkowski ym. 2004, 5-17.) Siirtoon tulisi aina valita alkio, jossa on mahdollisimman vähän fragmentteja, sillä tällaisilla alkiolla on parhaat mahdollisuudet kiinnittyä kohdun seinämään. (Pieters & Dumoulin 1996, 207; Baczkowski ym. 2004, 5-17.)

Mikäli lapsella on suuri todennäköisyys periä jommalta kummalta vanhemmaltaan vakava geneettinen sairaus, voidaan alkion valinnassa käyttää apuna myös DNA-tutkimusta. Tällöin 4-8-soluisesta alkiosta voidaan poistaa pipetin avulla yksi blastomeeri, jonka perimä tutkitaan saman päivän aikana ennen alkion siirtoa, käyttämällä apuna PCR-tutkimusta tai fluoresenssi *in situ* –hybridisaatiota. (Pieters & Dumoulin 1996, 207-213.)

1.2 Aiempia tutkimuksia aiheesta

Alkion valintaan ja implantaatioon liittyviä tutkimuksia löytyy paljon, mutta suuri osa niistä on ulkomaalaisia sekä käsittelee ainakin osittain eri parametreja kuin tämä opinnäytetyö. Tätä opinnäytetyötä täysin vastaavia tutkimuksia ei löytynyt, sillä alkion valinnassa voidaan ottaa huomioon lukuisia eri parametreja tai rajata tutkimusjoukkoa monin eri tavoin. Muissa aihepiirin tutkimuksissa on siis joko otettu huomioon eri tekijöitä kuin tässä opinnäytetyössä, tai päin vastoin jätetty huomiotta joitakin tekijöitä, joita tässä työssä otettiin tarkastelun kohteeksi. Tutkimusjoukkoa on voitu myös rajata eri perustein. Lisäksi monet tutkimuksista ovat jo useita vuosia vanhoja, ja jatkuvasti kehittyvässä alassa menetelmät ja välineet muuttuvat nopeasti, joten jo muutamankin vuoden vanhassa tutkimuksessa saattaa olla eroja tämänhetkiseen tietoon ja käytössä oleviin menetelmiin. Lisäksi menetelmät ja työvälineet vaihtelevat laboratorioittain, joten eri laboratoriossa tehtyjen tutkimusten tulokset eivät välttämättä päde muissa laboratorioissa. Tutkimusta on kuitenkin alalla tehty paljon, ja monen tutkimuksen tuloksia voidaan käyttää eri laboratorioissa vähintäänkin suuntaa-antavina.

Human Reproduction –lehdessä julkaisiin vuonna 1997 tutkimus (Ziebe ym. 1997), jossa käsiteltiin alkion valintaa sen morfologian ja blastomeerien

jakautumisnopeuden perusteella. Tutkimus koostui 1001:stä, yhteensä 880:lle potilaalle kolmella tanskalaisella klinikalla vuosina 1993-1996 tehdystä yhden, kahden tai kolmen alkion siirrosta. Kaikki alkiot olivat saaneet alkunsa IVF-menetelmällä hedelmöitetystä munasoluista, ja ne luokiteltiin ennen siirtoa pisteyttämällä alkiot niiden fragmentaation ja blastomeerien koon mukaisesti. Kaikki alkiot siirrettiin 2-päiväisinä, jolloin morfologian ohella niiden blastomeerien määrä dokumentoitiin. Tutkimuksen mukaan parhaaksi alkioiksi siirtoon valikoitui jakautumisnopeuden kannalta alkio, joka 2-päiväisenä oli 4-soluisen. 23% näistä alkioista implantoitui. 2-soluisista alkioista 12% ja 3-soluisista vain 7% implantoitui. Yli 4-soluisissa alkioissa implantaatioaste lähti puolestaan laskuun. Morfologian perusteella paras alkio oli sellainen, jossa fragmentaation määrä oli alle 10% alkion tilavuudesta. Näistä alkioista 21% implantoitui, kun puolestaan 10-50% fragmentaatiota sisältävillä alkioilla implantaatioaste oli vain 5%. Otettaessa huomioon sekä jakautumisnopeus että alkion morfologia, selkeästi suurimman implantaatioasteen (54%) saavuttivat 4-soluiset alkiot, joissa oli alle 10%:n fragmentaatiota.

Reproductive Biology and Endocrinology –lehdessä vuonna 2007 julkaistussa tutkimuksessa (della Ragione ym. 2007) puolestaan tutkittiin fragmentaation vaikutusta alkioden implantaatioon. Tutkimuksessa tehtiin vuosina 2001-2004 Brysselin yliopistollisessa sairaalassa yhteensä 312 yhden alkion siirtoa, joista 203 valittiin tarkastelun kohteiksi. Kaikki siirrettävät alkiot olivat hyvälaatuisia 5-päiväisiä blastokystivaiheeseen edenneitä alkioita, joiden kehitystä tarkasteltiin siirtoa edeltävinä päivinä. Tarkasteltavina oli sekä blastomeerien määrä että alkion morfologia. Tutkimustuloksia tarkasteltiin jakamalla siirretyt alkiot kahteen ryhmään: Implantoituneihin (93kpl) sekä implantoitumattomiin (110kpl). Tarkastelun tuloksena näiden kahden ryhmän välillä ei todettu eroja keskimääräisessä alkion jakautumisnopeudessa eikä hedelmöitysmenetelmässä, potilaiden iässä eikä saadun hormonilääkityksen määrässä. Fragmentaation määrä puolestaan vaihteli merkittävästi näiden kahden ryhmän välillä: Niistä alkioista, joissa fragmentaatiota oli 3-päiväisinä <10%, implantoitui 49,4%, eli lähes puolet. >10-50% fragmentaatiota 3-päiväisinä omaavista alkioista implantoitui vain 29,7%. Fragmentaation lisäksi

implantaatioon vaikutti tutkimuksen mukaan myös 5-päiväisen blastokystin kehitysvaihe siirtohetkellä. Tutkimustulokset siis osoittivat, että blastokystien siirrossa ainoat implantaatioon vaikuttavat parametrit olivat alkion fragmentaation määrä kolmantena päivänä sekä sen kehitysvaihe viidentenä päivänä hedelmöityksestä. Alkion blastomeerien määrällä toisena ja kolmantena päivänä ei siis tutkimuksen mukaan ollut vaikutusta implantaatioon blastokystivaiheisia alkioita siirrettäessä.

Tutkimusta alkioden valintaan liittyen on tehty myös Suomessa, josta esimerkkinä Human Reproduction –lehdessä vuonna 1999 julkaistu tutkimus (Vilksa ym. 1999), joka koostui kaikista vuonna 1997 Väestöliiton Helsingin lapettomuuslinikalla sekä Helsingin yliopistollisessa keskussairaalassa tehdyistä yhden alkion siirroista. Yhden alkion siirtoja molemmilla klinikoilla tehtiin vuonna 1997 yhteensä 168kpl, joista vain 74 oli elektiivisiä, eli niissä käytettiin apuna alkion valintaa. Lopuissa yhden alkion siirroissa vain yksi alkio oli saatu kasvatettua siirtoa varten. Näinä vuosina kahden alkion siirrot olivat vielä nykyistä paljon yleisempiä, ja niitä kyseisillä klinikoilla ja kyseisenä vuonna tehtiinkin reilusti enemmän, 742kpl. Elektiivisessä alkionsiirrossa alkioita tarkasteltiin noin kaksi vuorokautta munasolujen keräämisen jälkeen, ja ne luokiteltiin blastomeerien ja fragmentaation määrän mukaan. Suurin osa alkioista siirrettiin kohtuun 2-päiväisinä. Tutkimus osoitti, että blastomeerien määrällä, eli jakautumisnopeudella, on huomattava merkitys alkion implantaatioon. 2-päiväisinä siirretyistä alkioista, joissa oli siirtohetkellä neljästä viiteen blastomeeria, 35,8% johti alkion implantaatioon. Niistä 2-päiväisistä alkioista, joissa siirtohetkellä oli vain kahdesta kolmeen blastomeeria, ainoastaan 9,7% johti implantaatioon. Samoin todettiin myös fragmentaation määrän vaikuttavan, sillä niistä alkioista, joissa fragmentaatiota ei todettu toisena päivänä ollenkaan, implantaation saavutti 34%, kun taas <20% fragmentaatiota sisältävistä alkioista implantaatioon johti vain 26,7%. Lisäksi 20-50% fragmentaatiota sisältävistä alkioista vain 8,8% johti alkion implantaatioon.

3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT

Opinnäytetyön tarkoituksena on tutkia IVF- ja ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection) –menetelmien avulla hedelmöitettyjen alkoiden blastomeerien määrän ja jakautumisnopeuden merkitystä alkion implantaatioon. IVF-menetelmässä munasolu hedelmöitetään maljalla, pestyjen siittiöiden avulla (Väestöiitto 2012b). ICSI-menetelmällä, jonka Gianpiero Palermo kehitti 1990-luvun alussa, tarkoitetaan mikroinjektiohedelmöitystä, jossa siittiö viedään ohuen lasipipetin avulla suoraan munasolun sisään. (Palermo ym. 1992, 17-18.) Implantoituneeksi alkioiksi määritellään alkio, jonka siirto on johtanut kliiniseen raskauteen. Kliinisellä raskaudella tarkoitetaan sellaista raskautta, joka on todettu kliinisin menetelmin, esimerkiksi ultraäänen avulla (Gissler & Heino 2011).

Työn tavoitteena on siis selvittää, millainen alkio milläkin todennäköisyydellä johtaa raskauteen, sekä tehdä näistä laskelmista selkeät määrälliset ja prosentuaaliset taulukot. Tavoitteena on myös, että työn tulokset ja niistä tehdyt taulukot auttaisivat laboratoriohenkilökuntaa tulevaisuuden ongelmatilanteissa valitsemaan siirrettäväksi sellaisen alkion, joka suurimmalla todennäköisyydellä johtaa raskauteen.

4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

Opinnäytetyön aihe saatiin Turun yliopistollisen keskussairaalan naistentautien poliklinikalla toimivasta IVF-laboratoriosta, ja opinnäytetyön aineisto koostui kyseisessä laboratoriossa vuoden 2007 alusta vuoden 2011 loppuun mennessä suoritetuista pakastetun alkion siirroista. Tarvittavat tiedot kaikista tehdyistä alkionsiirroista sekä niiden tuloksista löytyivät laboratorion henkilökunnan ylläpitämistä, seuranta varten luoduista Excel-taulukosta. Tutkimuksen kohteena olivat siis seurantatalukot, ja koko työhön tarvittava aineisto toimitettiin valmiina, eikä niin sanotun raakamateriaalin hankintaan näin ollen vaadittu erityisiä toimenpiteitä. Taulukot on laatinut biologi Harri Mankonen ja ne ovat Varsinais-Suomen sairaanhoitopiirin omistuksessa. Taulukoissa kaikki alkion siirroissa olleet potilaat olivat esitetty anonymisti, ilman nimiä ja henkilötunnuksia.

Tutkimuslupa haettiin ylihoitaja Marjo Kauppilalta hoitotyön tutkimus- ja opinnäytetyön lupahakemuksella maaliskuussa 2012 ja tutkimuslupa myönnettiin huhtikuussa 2012, ennen käytännön osuuden aloittamista. Tutkimusaineiston käsittely sekä laskelmien ja taulukoiden laatiminen toteutettiin kesän 2012 aikana.

4.1 Tutkimusaineiston käsittely

Tutkimusaineiston käsittely alkoi valitsemalla ne kriteerit, joita siirretyistä alkoista tulnaisiin tarkastelemaan, sekä käymällä aineisto huolellisesti läpi puuttuvien tai virheellisten tietojen kartoittamiseksi. Biologi Harri Mankonen auttoi puuttuvien tietojen päivittämisessä sekä käytännön toteutuksen suunnittelussa. Aineisto käsitti vain pakastetun alkion siirrot, joten niin sanottuja tuoresiirtoja, joissa alkio siirretään hedelmöittämisen ja laboratoriossa viljelyn jälkeen suoraan kohtuun ilman pakastamista, ei tässä opinnäytetyössä otettu huomioon.

Tarkastelun kohteeksi päätettiin ottaa ainoastaan blastomeerien määrä, sillä muiden kriteerien, kuten tumien tai fragmentaation määrän, huomioiminen tekisi aineiston käsittelystä erittäin vaikeaa ja vaatisi luotettavien tutkimustulosten saamiseksi myös laajemman aineiston. Lisäksi positiivisiksi raskautuloksiksi laskettiin ainoastaan kliiniset raskaudet, eli sellaiset, joissa raskaus oli ultraäänellä, tai muuten kliinisesti, todennettavissa. Kaikkien alkioden kohdalla toisen päivän solumääräksi huomioitiin se solumäärä, joka alkiolla oli ollut sulatuksen jälkeen, sillä pakastuksen yhteydessä solumäärä oli joidenkin alkioden kohdalla muuttunut: Joko alkion solumäärä oli kirjattu väärin tai solut olivat ehtineet jakautua vielä sen jälkeen, kun niiden solumäärä oli tarkistettu mikroskoopilla ennen pakastusta.

Blastomeerien määrän lisäksi määriteltiin tutkimusaineistolle muita kriteereitä, jotka takaisivat aineiston homogeenisyyden ja näin mahdollisimman luotettavia tutkimustuloksia. Yhdeksi määrääväksi kriteeriksi valittiin se, että alkio oli pakastettu kaksipäiväisenä sekä siirretty kolmipäiväisenä, jolloin alkioita oli viljelty yön yli laboratoriossa. Mukaan valittiin lisäksi vain sellaiset alkiot, joiden solumäärä oli sulatettaessa säilynyt samana kuin pakastettaessa, tai joiden solumäärä oli heti sulatuksen jälkeen suurempi kuin ennen pakastusta. Niitä alkioita, jotka olivat menettäneet soluja pakastuksen yhteydessä, ei valittu mukaan tutkimukseen. Kahden alkion siirroista mukaan valittiin ne siirrot, joissa joko molemmat siirretyt alkiot olivat tuottaneet kliinisen raskauden, tai joissa raskautta ei tullut kummastakaan alkioista. Vain kyseisistä kahden alkion siirroista voitiin tietää, mikä alkio oli tuottanut raskauden ja mikä ei. Lisäksi näistä kahden alkion siirroista karsittiin vielä pois ne alkiot, joiden solumäärä sulatettaessa oli pienentynyt, joten osasta kahden alkion siirtoja huomioitiin vain toinen alkio.

Alkuperäinen aineisto käsitti lähes tuhat alkionsiirtoa ja yli 1300 siirrettyä alkioita. Aineisto käytiin läpi siirto siirrolta, ja taulukoista poistettiin kaikki ne alkionsiirrot, jotka eivät täyttäneet edellä mainittuja kriteereitä. Lisäksi poistettiin ne alkiot, joiden solumäärä kaksi- tai kolmipäiväisenä ei ollut tiedossa. Ne alkiot, joiden solumäärä oli ilmoitettu epäselvästi, esimerkiksi ”4-5”, pyöristettiin ylöspäin, sillä

alkio oli saattanut tarkasteluhetkellä olla juuri jakautumassa. Lopulliseen aineistoon valikoitui yhteensä 745 siirrettyä alkioita.

Alkiot luokiteltiin ryhmiin sen mukaan, mikä niiden solumäärä oli ollut toisena päivänä ja mikä kolmantena päivänä, ja laskettiin kunkin ryhmän implantaatioaste, eli montako prosenttia kunkin ryhmän alkioista oli tuottanut kliinisen raskauden. Lisäksi tehtiin laskelmat siitä, mitkä implantaatioasteet olivat huomioitaessa alkioiden solumäärä vain toisena tai kolmantena päivänä riippumatta siitä, mikä niiden solumäärä oli ollut seuraavana tai edellisenä päivänä. Kyseiset laskelmat työstettiin selkeiksi, ja helposti tulkittaviksi taulukoiksi ja kuvioiksi. Edellä mainittujen lisäksi laskettiin erilaisia kiinnostavia ja aineistoa paremmin hahmottavia tai kuvaavia avainlukuja, kuten potilaiden ikäjakauma, alkioiden hedelmöityksessä käytettyjen menetelmien osuudet sekä koko aineiston implantaatioaste.

4.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Tämä opinnäytetyö on tutkimusotteeltaan selvästi kvantitatiivinen, eli siinä tarkastellaan ja mitataan eri muuttujia ja niiden välisiä vuorovaikutuksia sekä lasketaan eri tekijöiden esiintymisen määrää. Kuten kvantitatiiviselle tutkimukselle on ominaista, tutkijan rooli on ulkopuolinen ja tutkimusaineistona käsitellään lukuja. (Kananen 2011, 12-15.) Tutkimus on myös retrospektiivinen, eli siinä tarkastellaan vain menneitä tapahtumia.

Perusjoukolla tarkoitetaan sitä kohderyhmää, joita tutkittava ilmiö koskettaa ja josta halutaan tutkimuksen avulla tehdä päätelmiä. Perusjoukko, eli populaatio, tulee määritellä ja rajata tarkasti jo ennen tutkimusta, sillä määrällinen tutkimus tarvitsee jo suunnitteluvaiheessa määrällistä tietoa tutkittavasta ilmiöstä. Otantatutkimuksessa perusjoukosta valikoituu tutkittavaksi otos, josta saatuja tuloksia voidaan käyttää yleistämällä koskemaan koko perusjoukkoa. Koko perusjoukon käsittävää tutkimusta kutsutaan kokonaistutkimukseksi (census), ja siinä siis mitataan kaikki perusjoukon tilastoyksiköt. Vaikka tutkimuksen alkuperäinen aineisto koostui perusjoukosta, jouduttiin siitä jättämään osa

tutkimuksen ulkopuolelle. Näin ollen tutkimuksen kohteeksi valikoitunut otos muodostui perusjoukosta harkinnanvaraisesti, otoksen ollessa kuitenkin määrällisesti mahdollisimman suuri. Harkinnanvaraisen otannan käyttö oli kuitenkin välttämätöntä tutkimusaineiston luokittelun mahdollistamiseksi sekä luotettavien tutkimustulosten saamiseksi. (Kananen 2011, 65-69.) Tämän tutkimuksen aineisto siis koostui kaikista vuosina 2007-2011 tehdyistä alkionsirroista, jotka täyttivät vaaditut, materiaalin käsittelyn yhteydessä tarkemmin muodostetut kriteerit.

4.3 Opinnäytetyön eettisten näkökohtien tarkastelu

Kaikki potilasmateriaali, jota opinnäytetyössä käsiteltiin, oli anonyymiä koko tutkimustyön ajan, eli potilaiden anonymiteetti oli tarkoin varjeltua. Myöskään muihin potilastietoihin tai potilastyössä käytettäviin tietokantoihin ei opinnäytetyön tekijä päässyt tutkimuksen aikana käsiksi. Koska tiedostoista, joita käsiteltiin, oli jo etukäteen poistettu potilaiden nimet ja henkilötunnukset, potilaat eivät olleet tunnistettavissa kyseisestä materiaalista.

Tutkimuksen tekijällä on velvollisuus noudattaa tieteellistä rehellisyyttä sekä huolellisuutta. Yksi tutkimuksen tärkeimpinä sääntöinä on, että tutkimustuloksia ei saa väärentää. Lisäksi kaiken tutkimuksen tavoitteena on, että tutkimus tuottaisi mahdollisimman tarkkoja ja luotettavia tutkimustuloksia. (Clakeburn & Mustajoki 2007, 51, 81-82.) Tutkimusjoukkoa rajatessa ja tuloksia kootessa pohdittiin edellämainittuja asioita ja otettiin ne työssä huomioon. Tutkimusjoukko rajattiin niin, että tutkimutulokset olisivat mahdollisimman informatiiviset ja luotettavat, tutkimusmateriaalin pysyessä samalla kuitenkin selkeästi käsiteltävänä ja tutkimusjoukko mahdollisimman suurena.

5 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, millainen alkio milläkin todennäköisyydellä johtaa raskauteen. Vaikka tarkasteltavia alkioita oli tutkimuksessa mukana 745 kappaletta, eli näennäisesti kohtalaisen suuri määrä, jakautuivat ne ryhmiteltäessä määrällisesti hyvin epätasaisesti eri ryhmien kesken, mistä syystä moni ryhmä koostui vain muutamasta alkioista, jotkut vain yhdestä tai kahdesta. Lopullisen aineiston 745 alkioista 180 oli johtanut raskauteen. Aineiston kaikkien alkioiden implantaatioaste oli näin ollen 24,2%. Nämä luvut ovat nähtävissä taulukossa 1.

Taulukko 1. Alkioiden implantaatioaste

	Kappalemäärä	Prosenttiosuus
ei raskautta	565	75,8
Kliininen raskaus	180	24,2
Yhteensä	745	100,0

Alkionsiirtoja lopullinen aineisto käsitti yhteensä 610 kappaletta, joista valtaosa, 71,3%, oli yhden alkion siirtoja. Kahden alkion siirtoja oli 28,7%, ja osasta kahden alkion siirtoja tarkasteluun valikoitui mukaan vain toinen alkio. Taulukossa 2 on nähtävissä IVF- ja ICSI –menetelmillä hedelmöitettyjen alkioiden, sekä yhden ja kahden alkion siirtojen, osuudet aineistossa.

Taulukko 2. Alkioiden siirrot

	Kappalemäärä	Prosenttiosuus
Yksi IVF-alkio	236	38,7
Kaksi IVF-alkiota	77	12,6
Yksi ICSI-alkio	199	32,6
Kaksi ICSI-alkiota	98	16,1
Yhteensä	610	100,0

Potilaiden ikä vaihteli 23:n ja 44:n ikävuoden välillä, keskiarvon ollessa 33 vuotta. Taulukossa 3 on esitetty alkion siirroissa käyneiden naisten ikä sekä kappalemäärissä että prosentuaalisesti.

Taulukko 3. Potilaiden ikä

Potilaan ikä	Kappalemäärä	Prosenttiosuus	Kumulatiivinen prosentti
23	1	0,2	0,2
24	8	1,3	1,5
25	9	1,5	3,0
26	14	2,3	5,2
27	20	3,3	8,5
28	20	3,3	11,8
29	31	5,1	16,9
30	50	8,2	25,1
31	42	6,9	32,0
32	49	8,0	40,0
33	55	9,0	49,0
34	51	8,4	57,4
35	54	8,9	66,2
36	53	8,7	74,9
37	43	7,0	82,0
38	39	6,4	88,4
39	41	6,7	95,1
40	23	3,8	98,9
41	3	0,5	99,3
42	2	0,3	99,7
43	1	0,2	99,8
44	1	0,2	100,0
Yhteensä	610	100,0	

Alkiot ryhmiteltiin sen mukaan, mikä niiden solumäärä oli ollut toisena päivänä ja mikä kolmantena. Taulukossa 4 on nähtävissä alkiot ryhmiteltynä. Vaaka-akselilla on blastomeerien määrä alkion ollessa 2-päiväinen ja pystyakselilla

blastomeerien määrä alkion ollessa 3-päiväinen. Kussakin laatikossa on näkyvissä alkioden implantaatioaste, sekä suluissa raskauden tuottaneiden alkioden määrällinen osuus aina kyseisen ryhmän alkioden kokonaismäärästä.

Taulukko 4. Alkiot ryhmiteltynä blastomeerien määrän mukaan

		Alkion blastomeerien määrä 2-päiväisenä							
		2pn	2	3	4	5	6	7	8
Alkion blastomeerien määrä 3-päiväisenä	3	-	0 % (0/3)	-	-	-	-	-	-
	4	-	18 % (5/28)	10 % (1/10)	5 % (1/20)	-	-	-	-
	5	-	0 % (0/19)	25 % (1/4)	16 % (6/38)	29 % (2/7)	-	-	-
	6	-	17 % (2/12)	0 % (0/13)	27 % (21/78)	0 % (0/4)	-	-	-
	7	-	33 % (2/6)	33 % (1/3)	19 % (21/108)	29 % (2/7)	0 % (0/5)	-	-
	8	0 % (0/1)	60 % (3/5)	67 % (2/3)	31 % (80/257)	0 % (0/25)	25 % (1/4)	50 % (1/2)	100 % (1/1)
	9	-	-	0 % (0/1)	41 % (13/32)	24 % (4/17)	20 % (1/5)	-	-
	10	-	-	0 % (0/2)	0 % (0/4)	33 % (1/3)	20 % (1/5)	-	-
	11	-	-	-	-	-	-	-	0 % (0/1)
	12	-	-	-	50 % (2/4)	-	50 % (1/2)	-	-
	13	-	-	-	50 % (1/2)	100 % (1/1)	-	-	-
	14	-	-	-	100 % (1/1)	-	-	-	-
	komp	-	-	-	0 % (0/1)	100 % (1/1)	-	-	-

Taulukosta on nähtävissä, että hyvin suuri osa alkioista on ollut toisena päivänä 4-soluisia ja kolmantena päivänä 8-soluisia. Tällaisia alkioita aineistossa oli 257 kappaletta. Kuten oletettiin, näiden alkioiden implantaatioaste oli hyvä, 31%. Koska kyseisiä alkioita on aineistossa ollut hyvin suuri määrä, voidaan tätä lukua myös pitää tilastollisesti jokseenkin luotettavana. Koska useassa ryhmässä alkiojoukko on pieni, ei tilastollisia testejä koettu kuitenkaan tarpeelliseksi tehdä. Myös alkiot, jotka ovat toisena päivänä olleet 4-soluisia ja kolmantena 9-soluisia, ovat tuottaneet paljon kliinisiä raskauksia, implantaatioasteen ollessa 41%. Kyseisiä alkioita aineistossa on kuitenkin määrällisesti paljon vähemmän, joten prosenttiosuutta ei voida pitää täysin luotettavana. Tämä ryhmän korkeaan implantaatioasteeseen saattaa vaikuttaa se, että alkion solumäärä lasketaan juuri ennen siirtoa, mikä on normaalisti vasta myöhemmin päivällä, kun taas kolmannen päivän tilanne yleensä tarkistetaan ensimmäisen kerran aikaisin aamulla. Näin ollen osa alkioista, jotka siirtohetkellä ovat olleet 9-soluisia, ovat mahdollisesti kolmannen päivän aamulla olleet 8-soluisia, mistä syystä näitä voidaan käsitellä yhtenä ryhmänä. Mikäli molemmat ryhmät lasketaan yhteen, saadaan implantaatioasteeksi 32%.

Toiseksi suurin ryhmä on toisena päivänä 4-soluiset ja kolmantena päivänä 7-soluiset alkiot. Tällaisia alkioita siirrettiin yhteensä 108 kappaletta implantaatioasteen ollessa 19%. Mielenkiintoinen huomioitava on kuitenkin ryhmä, jossa toisena päivänä alkiot olivat niin ikään 4-soluisia, mutta kolmantena 5-soluisia. Tässä ryhmässä implantaatioaste oli 27%, alkioiden määrän ollessa myös kohtalaisen suuri, 78 kappaletta. Tämä niin sanottu parillisuus voidaan huomioida myös muiden alkioryhmiensä kohdalla: Mikäli alkion solumäärä on kasvanut parillisen määrän toisesta päivästä kolmanteen päivään, on implantaatioaste huomattavasti korkeampi kuin niillä alkoilla, joiden solumäärä on lisääntynyt parittoman määrän. Esimerkiksi alkiot, jotka toisena päivänä ovat olleet 5-soluisia, ovat tuottaneet huomattavasti paremmin raskauksia silloin, kun ne ovat kolmantena päivänä olleet 7- tai 9-soluisia, kuin jos ne ovat olleet 6- tai 8-soluisia. Toki näissäkin ryhmissä alkio määrät ovat pieniä, mutta seikka on silti huomion arvoisen. Itseasiassa toisena päivänä 5- ja kolmantena päivänä 8-soluisia alkioita on ollut suhteellisen suuri määrä, 25

kappaletta, implantaatioasteen ollessa 0%. Sama parillisuuden ilmiö on nähtävissä myös niissä alkioissa, jotka ovat toisena päivänä olleet 2-, 3- tai 4-soluisia.

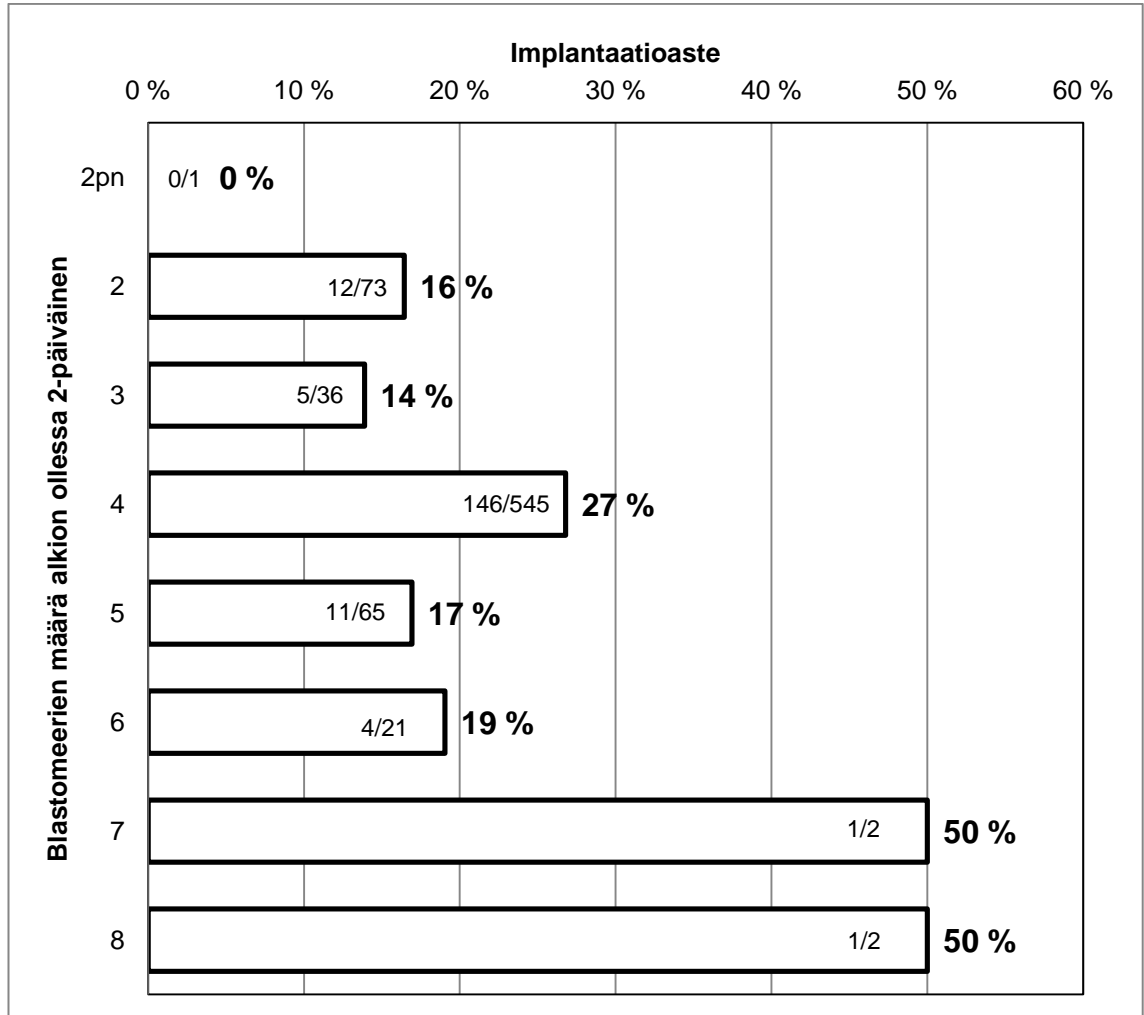
Yhden merkittävän ryhmän muodostavat niin sanotut pysähtyneet alkiot, eli sellaiset alkiot, joiden solumäärä on ollut sama toisena ja kolmantena päivänä. Näiden alkioiden määrä aineistossa on kohtalaisen pieni, mutta implantaatioasteet yllättävän korkeita. Esimerkiksi 5-soluisia pysähtyneitä alkioita oli seitsemän kappaletta, joista kaksi (29%) oli tuottanut raskauden. Yhteensä pysähtyneitä alkioita aineistossa oli 28 kappaletta, joista neljä oli tuottanut raskauden, implantaatioasteen ollessa tällöin 14%.

Eräs mielenkiintoa herättävä ryhmä on niin sanotut nopeasti jakautuvat alkiot. Näillä tarkoitetaan sellaisia alkioita, joiden solumäärä kolmantena päivänä on huomattavan suuri, ja joiden solumäärä on siis lisääntynyt huomattavasti toisesta kolmanteen päivään. Perinteisesti nopeasti jakautuvia alkioita on pidetty epänormaaleina ja suhteellisen huonosti implantoituvina (Mankonen 2012). Tässä tutkimuksessa yli kymmenen solua kolmantena päivänä sisältäviä alkioita oli yhteensä 13 kappaletta, joista 7 (54%) oli johtanut raskauteen. Vaikka tämä ryhmä onkin määrältään pieni, tämän aineiston perusteella nopeasti jakaantuvien alkioiden mahdollisuudet tuottaa raskaus on hyvä, eikä kyseisten alkioiden siirtoa tule välttää.

Edellä esitetyn ryhmittelyn lisäksi laskettiin alkioiden implantaatioasteet huomioiden alkion blastomeerien määrä ainoastaan päivänä kaksi tai päivänä kolme. Näissä laskelmissa ei siis otettu huomioon sitä, mikä alkion solumäärä oli edellisenä tai seuraavana päivänä. Kuviossa 1 on nähtävissä alkioiden implantaatioasteet päivän 2 solumäärän mukaan. Kuviossa 2 on nähtävissä alkioiden implantaatioasteet päivän 3 solumäärän mukaan.

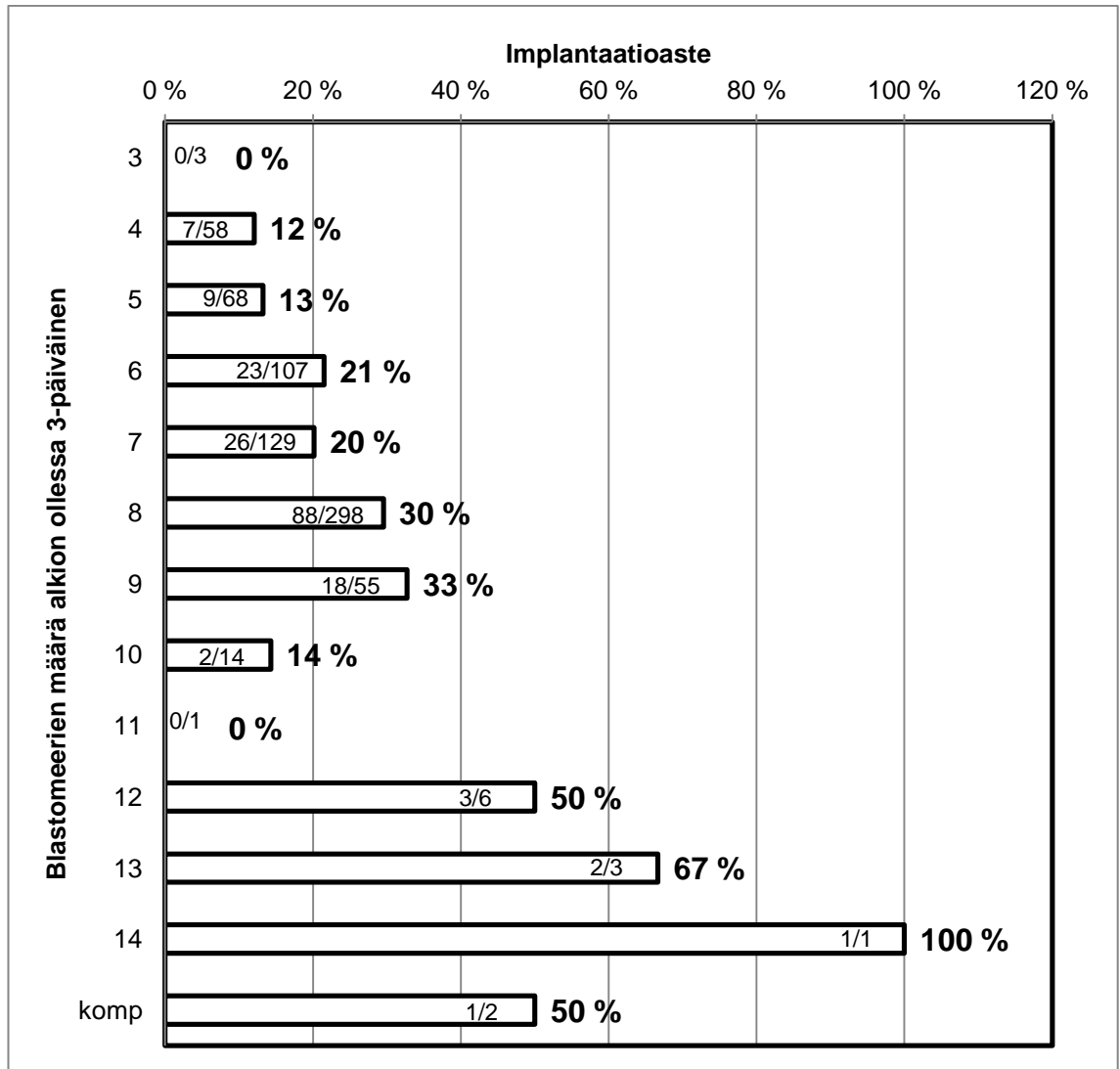
Kuvion 1 mukaan suurin osa aineiston alkioista oli toisena päivänä 4-soluisia. Tämä ryhmä myös tuotti hyvin raskauksia, implantaatioasteen ollessa 27%. Kuvioista voidaan myös huomata, että ne alkiot, joissa toisena päivänä oli nähtävissä parillinen määrä soluja, ovat tuottaneet hieman paremmin

raskauksia kuin toisena päivänä parittoman solumäärän sisältäneet alkio. Myös tässä on siis nähtävissä parillisuuden edullisuus implantaatioon.



Kuvio 1. Implantaatioaste alkion toisena päivänä lasketun solumäärän mukaan

Määrällisesti suurimman ryhmän kuviossa 2 muodostavat 8-soluiset alkio, jotka yhdessä 9-soluisten alkoiden kanssa muodostavat myös eniten raskauksia tuottaneen alkioryhmän. Myös kuviossa 2 on taulukon 4 tapaan nähtävissä nopeasti jakautuvien alkoiden potentiaali tuottaa hyvin klinisiä raskauksia, vaikkakin näitä alkioita on aineistossa suhteellisen pieni määrä.



Kuvio 2. Implantaatioaste alkion kolmantena päivänä lasketun solumäärän mukaan

6 POHDINTA

6.1 Tutkimustulosten pohdinta

Tämä tutkimus sekä tuki aiempia tutkimustuloksia, joiden mukaan toisena päivänä 4-soluiset ja kolmantena päivänä 8-soluiset alkiot tuottavat hyvin raskauksia, että toi esiin myös joitakin uusia ja mielenkiitaisia huomioita. Vaikka taulukkoon muodostetut alkioryhvät olivat osin määrällisesti liian pieniä, jotta tilastollisesti luotettavia ja yleispäteviä huomioita voitaisiin tehdä, tutkimus toteutti sille asetetun tavoitteen, joka oli tuoda uutta tietoa asianomaiselle laboratoriolle liittyen laboratorion omiin alkionsiirtoihin.

Tutkimuksessa ei otettu huomioon muita alkion ominaisuuksia, kuten fragmentaatiota, havaittujen tumien määrää sekä solujen muotoa ja kokoeroja. Näin ollen tarkastelussa jätettiin huomioimatta monia seikkoja, jotka solumäärän ohella ovat saattaneet vaikuttaa alkion implantaatioon. Mikäli nämä tekijät olisi tutkimuksessa huomioitu, tutkimustulokset olisivat voineet poiketa työssä esitetyistä tuloksista.

Lisäksi tuloksissa tulee huomioida, että siirrettyjen alkioiden solumäärä on tarkastettu juuri ennen siirtoa, eli myöhemmin päivällä, kun taas normaalisti kyseisen päivän solumäärä tarkastetaan saman päivän aamuna. Näin alkioissa on siirtohetkellä saattanut olla eri määrä soluja, kuin mikä niiden solumäärä olisi ollut kolmantena päivänä, mikäli solumäärä olisi laskettu vakioidusti samaan aikaan kolmannen päivän aamuna.

Koska käsiteltävä aineisto koostui pakastetun alkion siirroista, saattaa olla, että moni alkio oli ollut ennen siirtoa pakastettuna useita vuosia. Näin ollen mm. pakastusmenetelmät ja pakastukseen käytetyt liuokset, joissa alkioita käsitellään, ovat saattaneet joidenkin alkioiden kohdalla olla erilaiset.

Yksi huomio, joka on hyvä tehdä tutkimustuloksia pohdittaessa, liittyy muista tutkimuksista saatuihin käsityksiin, jotka ovat saattaneet johtaa tietyn alkion valintaan: Muihin tutkimuksiin vedoten ollaan esimerkiksi siirtoon voitu valita

sellainen alkio, joka toisena päivänä on ollut 4-soluinen ja kolmantena 8-soluinen, mutta joka on saattanut sisältää paljon fragmentaatiota. Toinen valittavissa ollut alkio, jonka solumäärä on ollut eri, mutta fragmentaation määrä vähäisempi, on saatettu hylätä, perustuen aiempiin tutkimustuloksiin. Epävarmaa on, onko tämä tekijä saattanut vaikuttaa tässä tutkimuksessa saatuihin tuloksiin. Jos siirtoon olisi joissakin tapauksissa valittu vähemmän fragmentoitunut alkio solumäärästä riippumatta, implantaatioasteet olisivat voineet olla erilaiset.

6.2 Tutkimuksen luotettavuus

Tutkimusjoukkoon valittiin mukaan kaikki edellä mainitut kriteerit täyttävät alkio, jotta tutkimusjoukosta saataisiin mahdollisimman suuri ja näin ollen tuloksista mahdollisimman luotettavia. Tästä syystä esimerkiksi alkion siirroissa olleiden naisten ikäjakauma on suuri eikä voida tietää, onko potilaan ikä siirtohetkellä tai munasolujen keräyshetkellä mahdollisesti vaikuttanut tutkimustuloksiin.

Aineistoa käsiteltiin huolellisesti ja jokainen alkionsiirto käytiin yksitellen läpi, jotta voitiin mahdollisimman hyvin välttää virheet valikoitaessa käsiteltäviä alkioita. Jokainen työvaihe talletettiin erikseen omaksi tiedostokseen, jotta mahdolliset virheet saataisiin jäljitettyä ja tehtyjä ratkaisuja tarkistettua tutkimusmateriaalista myös jälkikäteen.

Koska alkioiden valinnan yhteydessä tehty solumäärien lasku ei ole täysin vakioitu, eli alkioiden solumääriä ei ole katsottu aina samana kellonaikana ja saman henkilön toimesta, saattaa tällä olla jonkin verran vaikutusta tutkimuksen tuloksiin. Kaikki alkioita siirtoon valinneet ja blastomeerien määrää laskeneet henkilöt ovat kuitenkin alalla pitkään jo työskennelleitä alan ammattilaisia, joten vakioinnin puutteesta huolimatta voidaan olettaa, että ilmoitetut alkiomäärät vastaavat todellisuutta.

6.3 Jatkotutkimusaiheet

Mahdollisia jatkotutkimusaiheita on olemassa monia, sillä alan ollessa verrattain nuori ja jatkuvasti kehittyvä, myös uutta tutkimusta tarvitaan jatkuvasti ohjaamaan alan kehitystä oikeaan suuntaan. Monet seikat, joihin tässä tutkimuksessa ei ollut mahdollista kiinnittää huomiota, tuottaisivat mielenkiintoisia jatkotutkimuksia.

Koska tutkimukseen käytetty alkuperäisaineisto käsitti blastomeerien määrän lisäksi myös monia muita alkion ominaisuuksia, voisi yhtenä jatkotutkimusaiheena käsitellä näiden muiden ominaisuuksien vaikutusta alkion implantaatioon. Oman tutkimuksensa saisi esimerkiksi fragmentaation määrän vaikutuksesta alkion implantaatioon.

Tämän opinnäytetyön kaltainen tutkimus suuremmalla alkiomäärällä olisi tilastollisesti luotettavampi ja antaisi entistä paremman kuvan alkioden kyvystä tuottaa raskauksia. Tutkimuksen kohteeksi voisi siis ottaa mukaan alkion siirtoja joko pidemmältä ajanjaksolta, tai useammasta eri laboratoriosta. Lisäksi oman tutkimuksensa voisi tehdä niistä alkioista, jotka pakastuksen yhteydessä olivat menettäneet soluja ja joita näin ollen ei tähän kyseiseen tutkimukseen luettu mukaan.

Yksi erityisen mielenkiintoinen jatkotutkimusaihe olisi nopeasti jakautuvien alkioden implantaatiopotentiaalin tutkiminen. Tämän tutkimuksen mukaan kyseiset alkiot tuottavat hyvin kliinisiä raskauksia, mutta aineiston ollessa hyvin pieni, ei tutkimustulos myöskään ole riittävän luotettava. Suuremman aineiston avulla voitaisiin selvittää, pitävätkö aiemmat käsitykset nopeasti jakautuvien alkioden huonosta implantaatiopotentiaalista paikkansa, vai onko kyseisillä alkioilla luultua parempi kyky tuottaa raskauksia.

LÄHTEET

- Arora, M.P. 2009. Embryology. India: Himalaya Publishing House.
- Baczowski, T.; Kurzawa, R.; Glabowski, W. 2004. Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. *Reproductive Biology*. Vol. 4, No. 1, 5-22.
- Bar-Yoseph, H.; Levy, A.; Sonin, Y.; Alboteanu, S.; Levitas, E.; Lunenfeld, E.; Har-Vardi, I. 2011. Morphological embryo assessment: reevaluation. *Fertility and Sterility*. Vol. 95, No. 5, 1624-1628.
- Bos-Mikich, A.; Mattos, A.L.G. & Ferrari, A. N. 2001. Early cleavage of human embryos: An effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. *Human Reproduction*. Vol. 16, No. 12, 2658-2661.
- Clarkeburn, H. & Mustajoki, A. 2007. Tutkijan arkipäivän etiikka. Tampere: Vastapaino.
- Dale, B. & Elder, K. 2000. *In Vitro Fertilization*. Port Chester, NY, USA: Cambridge University Press.
- della Ragione, T.; Verheyen, G.; Papanicolaou, E.G.; Van Landuyt, L.; Devroey, P. & Van Steirteghem, A. 2007. Developmental stage on day-5 and fragmentation rate on day-3 can influence the implantation potential of top-quality blastocysts in IVF cycles with single embryo transfer. *Reproductive Biology and Endocrinology*. Vol 5. Art. No. 2.
- Desai, N.; Goldstein, J.; Rowland, D.; Goldfarb, J. 2000. Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Human Reproduction*. Vol. 15, No. 10, 2190-2196.
- Ding, J.; Pry, M.; Rana, N.; Dmowski, W.P. 2004. Improved outcome of frozen-thawed blastocyst transfer with Menezo's two-step thawing compared to the stepwise thawing protocol. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. Vol. 21, No. 6, 203-210.
- Gardner, D.; Lane, M.; Watson, A. 2004. *A laboratory guide to the mammalian embryo*. New York: Oxford University press.
- Gissler, M. & Heino, A. 2011. Hedelmöityshoidot 2009-2010. SVT (Suomen virallinen tilasto) 15/2011. Helsinki: Terveystieteiden tutkimuskeskus.
- Hnida, C.; Engenheiro, E.; Ziebe, S. 2004. Computer-controlled, multilevel, morphometric analysis of blastomere size as biomarker of fragmentation and multinuclearity in human embryos. *Human Reproduction*. Vol. 19, No. 2, 288-293.
- Kananen, J. 2011. *Kvantti: Kvantitatiivisen opinnäytetyön kirjoittamisen käytännön opas*. Jyväskylä: Jyväskylän ammattikorkeakoulu.
- Kawachiya, S.; Bodri, D.; Shimada, N.; Kato, K.; Takehara, Y.; Kato, O. 2011. Blastocyst culture is associated with an elevated incidence of monozygotic twinning after single embryo transfer. *Fertility and Sterility*. Vol. 95, No. 6, 2140-2142.
- Klemetti, R. 2006. *The Use of Assisted Fertilization in Finland: Health Effects and Equity*. Academic Dissertation. Tampere: University of Tampere.
- Koskimies, A. 2004. *HYKS Naistenklinikka, Helsinki. Teoksessa Yhtä matkaa – IVF-historiikki*. Helsinki: Oy Organon Ab, 7-15.

Lemmen, J.; Agerholm, I.; Ziebe, S. 2008. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*. Vol. 17, No. 3, 285-391.

Lens, J.W. & Rijnders, P.M. 1996. *The embryo – practice*. Teoksessa Bras, M.; Lens, J.W.; Piedriet, M.H.; Rijnders, P.M.; Verveld, M.; Zeilmaker, G.H. (toim.) *IVF Lab: Laboratory aspects of in-vitro fertilization*. The Netherlands: N.V. Organon, 147-164.

Mankonen, H. 2012. *Henkilökohtainen tiedonanto*.

MSD 2011. *Hedelmöityshoidot –opas*. Espoo: MSD.

Niemi, M. & Väänänen, K. 1993. *Ihmisyksilön kehitysbiologia*. Helsinki: Duodecim.

Palermo, G.; Joris, H.; Devroey, P.; Van Steirteghem, A.C. 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. Vol. 340, No. 8810, 17-18.

Pantos, K.; Makrakis, E.; Chronopoulou, M.; Biba, M.; Perdikaris, A.; Dafereras, A. 2008. Day 4 versus day 3 embryo transfer: a prospective study of clinical outcomes. *Fertility and Sterility*. Vol. 89, No. 3, 573-577.

Payne, J.; Raburn, D.; Couchman, G.; Price, T.; Jamison, M.; Walmer, D. 2005. Relationship between pre-embryo pronuclear morphology (zygote score) and standard day 2 or 3 embryo morphology with regard to assisted reproductive technique outcomes. *Fertility and Sterility*. Vol. 84, No. 4, 900-909.

Pieters, M.H.E.C.; Dumoulin, J.C.M. 1996. *Pre-implantation diagnostics*. Teoksessa Bras, M.; Lens, J.W.; Piedriet, M.H.; Rijnders, P.M.; Verveld, M.; Zeilmaker, G.H. (toim.) *IVF Lab: Laboratory aspects of in-vitro fertilization*. The Netherlands: N.V. Organon, 205-228.

Sariola, H. 2006. *Elämä – lyhyt oppimäärä*. Helsinki: Duodecim.

Sariola, H.; Frilander, M.; Heino, T.; Jernvall, J.; Partanen, J.; Sainio, K.; Salminen, M.; Thesleff, I. 2006. *Kehitysbiologia – Solusta yksilöksi*. Helsinki: Duodecim.

Sastry, K.V. & Shukal, V. 2010. *Developmental biology*. India: Rastogi Publications.

Seli, E. (toim.) 2011. *Infertility*. UK: Blackwell publishing.

Senn, A.; Urner, F.; Chanson, A.; Primi, M-P.; Wirthner, D.; Germond, M. 2006. Morphological scoring of human pronuclear zygotes for prediction of pregnancy outcome. *Human Reproduction*. Vol. 21, No. 1, 234-239.

van Montfoort, A.; Dumoulin, J.; Land, J.; Coonen, E.; Derhaag, J.; Evers, J. 2005. Elective single embryo transfer (eSET) policy in the first three IVF/ICSI treatment cycles. *Human Reproduction*. Vol. 20, No. 2, 433-436.

Van Royen, E.; Mangelschots, K.; Vercruyssen, M.; De Neubourg, D.; Valkenburg, M.; Ryckaert, G.; Gerris, J. 2003. Multinucleation in cleavage stage embryos. *Human Reproduction*. Vol. 18, No. 5, 1062-1069.

Veeck, L.; Bodine, R.; Clarke, R.; Berrios, R.; Libraro, J.; Moschini, R.M.; Zaninovic, N.; Rosenwaks, Z. 2004. High pregnancy rates can be achieved after freezing and thawing human blastocysts. *Fertility and Sterility*. Vol. 82, No. 5, 1418-1427.

Vilksa, S.; Tiitinen, A.; Hydén-Granskog, C. & Hovatta, O. 1999. Elective transfer of one embryo results in an acceptable pregnancy rate and eliminates the risk of multiple birth. *Human Reproduction*. Vol. 14, No. 9, 2392-2395.

Väestöliitto 2012a. Tieteellinen tutkimus. Viitattu 9.2.2012 <http://www.vaestoliitto.fi/> > Lapsettomuus > Lapsettomuushoidot > Tieteellinen tutkimus.

Väestöliitto 2012b. Koeputkihedelmöityshoidot (IVF). Viitattu 14.4.2012 <http://www.vaestoliitto.fi/> > Lapsettomuus > Lapsettomuushoidot > Hedelmöityshoidot > Koeputkihedelmöitys.

Weima, S.M. 1996. The embryo – theory. Teoksessa Bras, M; Lens, J.W; Piedriet, M.H; Rijnders, P.M; Verveld, M; Zeilmaker,G.H. (toim.) IVF Lab: Laboratory aspects of in-vitro fertilization. The Netherlands: N.V. Organon, 165-176.

Ziebe, S.; Petersen, K.; Lindenberg, S.; Andersen, A.-G.; Gabrielsen, A. & Nyboe Andersen, A. 1997. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. Human Reproduction. Vol. 12, No. 7, 1545-1549.