

**Viljelyliuoksen ja -menetelmän vaikutukset alkioiden laatuun,  
raskauksiin ja oksidatiiviseen stressiin koeputkihedelmöityksessä**

Maria Vitie

Pro gradu -tutkielma  
Jyväskylän Yliopisto  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
Lokakuu 2006

## **Alkusanat**

Tämä tutkimus on tehty Helsingissä Väestöliitto ry:n lapsettomuuslinikassa huhti-joulukuussa 2005. Klinikon ylilääkäri Anne-Maria Suikkari antoi mahdollisuuden vuoden pituiseen, erittäin mielenkiintoiseen työrupeamaan solulaboratoriossa ja työn ohessa tekemääni gradututkimukseen.

Kiitos ja kumarrus ohjaajilleni, biologeille Timo Tuurille ja Sirpa Mäkiselle, jotka paneutuivat kanssani tutkimuksen suunnitteluun ja antoivat asiantuntijan neuvoja kysymyksiini, palautetta graduteksteihin ja tilastoihin.

Lämmin kiitos toimivalle solulaboratoriolle ja kokeneelle henkilökunnalle; Lea Husu, Ritva Tainio ja Lilli Weckman sekä spermalaboratorion henkilökunnalle. Gradututkimukseni lisäsi reilusti heidän työmääräänsä, silti sain osakseni kannustusta ja hymyä.

Kiitos yhteistyöstä LKT Risto Lapatolle (Biomedicum Helsinki), joka toimi asiantuntijana hapettumiseen ja happiradikaalien vaikutukseen liittyvässä osassa tutkimusta ja Sari Lindén:lle (Biomedicum Helsinki), joka analysoi suuren määrän lapsettomuuslinikalta tuotuja liuosnäytteitä. Haluan kiittää heitä yhteistyöstä liuosmittausten järjestämisessä ja tulkinnessa.

Kiitos koko lapsettomuusklinikan henkilökunnalle mukavasta ilmapiiristä ja kannustavasta, ennakkoluulottomasta asenteesta.

Lopuksi vielä kiitos tämän tutkielman tarkkasilmäisesti tarkastaneelle biologi Nina Lahdenpohjalle Tampereen klinikalta.

---

<b>Tekijä:</b>	Maria Vitie	
<b>Tutkielman nimi:</b>	Viljelyliuoksen ja -menetelmän vaikutus alkioiden laatuun, raskauksiin ja oksidatiiviseen stressiin koeputkihedelmöityksessä	
<b>English title:</b>	Effect of culture medium and culture system on embryo quality, pregnancy rate and oxidative stress in IVF	
<b>Päivämäärä:</b>	18.10.2006	<b>Sivumäärä:</b> 68
<b>Laitos:</b>	Bio- ja ympäristötieteiden laitos	
<b>Oppiaine:</b>	Solubiologia	
<b>Tutkielman ohjaaja(t):</b>	FT Timo Tuuri, FM Sirpa Mäkinen	

---

### Tiivistelmä:

Koeputkihedelmöityksessä (*in vitro* fertilization, IVF) munasolujen hedelmöittyminen ja alkioiden varhaiskehitys tapahtuu laboratorioissa. Alkioiden laadulla on merkittävä vaikutus hoidon onnistumiselle. Kaupalliset liuokset ovat kehittyneet ja niiden koostumukset eroavat proteiini- ja energianlähteiden ja muiden ainesosien suhteen. Tavoitteena on tukea alkion luonnollisia olosuhteita ja aineenvaihduntaa.

Tässä tutkimuksessa vertailtiin kolmen erilaisen alkioviljelyliuoksen ja kahden eri viljelymenetelmän vaikutuksia alkioiden laatuun ja raskaustuloksiin kahden ja kolmen vuorokauden viljelyssä. Koeputki- ja mikrohedelmöityshoitoja oli tutkimuksessa huhti-joulukuun 2005 aikana 227. Potilaat jaettiin sattumanvaraisesti ryhmiin ennen munasolujen keräystä. Liuokset olivat Universal IVF ja ISM1 (MediCult, Jyllinge, Denmark) ja Vitrolife GIII -sarjan G-FERT / G-1 PLUS (Vitrolife, Kungsbacka, Sweden). Vertailussa oli neljä ryhmää, joissa alkionsiirrot tehtiin toisena päivänä munasolukeräyksestä. Universal IVF -liuosta verrattiin keskikuoppamalja- ja pisaraviljelyssä, ISM1 ja G-1 -liuoksia vain pisaraviljelyssä. Lisäksi kolmannen päivän alkionsiirroissa oli kaksi liuosryhmää, Universal IVF avomaljaviljely ja Vitrolife GIII pisaraviljely. Jakautuneita alkioita oli tutkimuksessa kaikkiaan 1376.

Ilmakehän happipitoisuudessa alkioit altistuvat hapettaville olosuhteille, mistä aiheutuu oksidatiivista stressiä jos antioksidanttiset suojamekanismit ovat riittämättömiä. Glutationi on tioli ja yksi alkion tärkeimmistä antioksidanteista. Liuosten ja alkioiden kykyä vastustaa hapettumisen vaikutuksia voidaan arvioida hapetus-pelkistysreaktioihin osallistuvien molekyylien avulla. Tutkimuksen aikana liuoksista otettiin näytteitä, joista määritettiin HPLC-nestekromatografian avulla tiolien ja nukleotidien pitoisuuksia.

Alkioiden ominaisuudet arvioitiin alkionsiirtopäivänä. Vitrolife G-1 -ryhmässä oli paras alkioiden jakautumisnopeus ja laatu kahden ja kolmen vuorokauden viljelyssä. Kliinisiä raskauksia ryhmässä alkoi toiseksi eniten (33%). Heikoin alkioiden laatu oli Universal IVF avomaljaviljelyssä (kliinisiä raskauksia 27%). Eniten raskauksia alkoi Universal IVF pisaraviljelyryhmässä (42%), jossa alkioiden jakautuminen oli kuitenkin hitainta. ISM1 -ryhmässä alkioiden laatu oli lähes sama kuin Universal IVF pisaraviljelyssä, mutta kliinisiä raskauksia oli vähiten (23%). Vitrolife GIII vaikutti ensimmäisen vaiheen perusteella tehokkaimmalta. Suuremmat potilasmäärät olisivat mahdollistaneet luotettavampien päätelmien tekemisen raskaustulosten suhteen. Pakastetun alkion siirtojen jälkeen saatavat yhdistetyt raskaustulokset antavat enemmän tietoa ryhmistä ja alkioiden laadun yhteydestä raskauksien todennäköisyyteen.

Liuoksen koostumuksen on osoitettu vaikuttavan alkioiden laatuun. Universal IVF on muihin verrattuna yksinkertainen perusliuos. ISM1:ssä on metioniinia, vitamiineja ja nukleotideja, Vitrolife G1:ssä EDTA:ta, alanyyli-glutamiinia ja hyaluronaania. Tuoreiden liuosten glutationi-, kysteiini- ja hypoksantiinipitoisuuksissa oli eroja. Nämä pitoisuudet muuttuivat viljelyn aikana liuoksen, viljelymenetelmän ja alkioviljelyn mukaan. Näytteitä oli kuitenkin vähän ja mittaukset alustavia. Keskikuoppamalja- ja pisaraviljelynäytteiden tiolipitoisuuksissa oli viljelytavasta johtuvia eroja. Kysteiini- ja glutationipitoisuuksissa havaittiin korrelaatiota. ISM1:ssä oli muita suuremmat hypoksantiinin ja kysteiinin pitoisuudet. Metioniini näyttää lisäävän liuoksen kysteiiniä. Lisätutkimusta tarvitaan liuosten ja viljelytavan vaikutusten selvittämiseksi. Pisaraviljelyllä näyttää olevan alkion kehitykselle ja aineenvaihdunnalle hyödyllisiä vaikutuksia, joiden yksityiskohtia olisi syytä selvittää.

---

**Avainsanat:** koeputkihedelmöitys, alkio, viljelyliuos, oksidatiivinen stressi, tioli

---

**Author:** Maria Vitie  
**Title of thesis:** Effect of culture medium and culture system on embryo quality, pregnancy rate and oxidative stress in IVF  
**Finnish title:** Viljelyliuoksen ja -menetelmän vaikutus alkioiden laatuun, raskauksiin ja oksidatiiviseen stressiin koeputkihedelmöityksessä  
**Date:** 18.10.2006 **Pages:** 68  
**Department:** Department of Biological and Environmental Science  
**Chair:** Cell Biology  
**Supervisor(s):** Timo Tuuri, PhD, Sirpa Mäkinen, MSc

---

**Abstract:**

*In vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) are methods for fertilizing embryos in a laboratory. Embryo quality is an important factor in achieving a pregnancy. Embryos are affected by culture conditions such as culture media. There has been much improvement in culture media resulting in differences between media compositions regarding protein, energy substrates and many other ingredients. The goal is to provide a natural environment for embryos and to prevent metabolic stress.

The aim of this study was to compare the effects of three different IVF culture media (Universal IVF Medium and ISM1 from MediCult [Jyllinge, Denmark] and GIII series [G-FERT / G-1 PLUS] from Vitrolife [Kungsbacka, Sweden] on embryo quality and pregnancy rate. 227 IVF and ICSI cycles were included between April and December 2005. Patients were randomly divided into study groups the day before oocyte retrieval. There were four groups in two-day cultures and two groups (Universal IVF open culture and Vitrolife G-1 droplet culture) in three-day cultures. Universal IVF Medium was compared in both an open dish and a droplet culture system in two day embryo culture. ISM1 and Vitrolife G-1 media were used in droplet cultures only. The total number of cleaved embryos was 1376.

Embryos are exposed to oxidative damage by the atmospheric oxygen. This can lead to oxidative stress if not enough protected by antioxidants in embryos and culture media. Glutathione is one of the most important antioxidants in embryos. The oxidative status of cells can be estimated according to redox molecules like thiols. During this study medium samples were taken to measure the concentrations of thiol compounds and nucleotides in media using high performance liquid chromatography.

Embryos were evaluated for cleavage rate and quality on the day of transfer on day 2 or 3 after insemination or microinjection. Vitrolife group had best cleavage rates and embryo quality in both two and three day culture compared to others. Clinical pregnancy rate (PR) in this group was second best (33%). Universal IVF open culture group had the least number of good quality embryos (PR 27%). The cleavage of embryos in Universal droplet culture was slower compared to other groups but the PR rate was highest in this group (42%). ISM1 group embryos had average quality but lowest PR (23%). Vitrolife GIII seemed to best support embryo development. More patients would have been needed for reliable conclusions regarding pregnancy rates. After frozen embryo transfers the cumulative pregnancy rates will reveal more on the effect of media and the relationship between embryo quality and pregnancy rate.

Media composition has been shown to effect embryo quality. Universal IVF Medium is a simple basic medium. In ISM1 methionine, vitamins and nucleotides are added. Vitrolife G-1 includes EDTA as a chelating agent, alanyl-glutamine as a stable glutamine source and hyaluronan. Differences were found in the concentrations of glutathione, cysteine and hypoxanthine in fresh media. There were changes in these concentrations after incubation according to medium and culture system used. Changes occurred also when culturing embryos although samples were very small. Some correlation was seen in the concentrations of glutathione and cysteine. ISM1 had high concentrations of hypoxanthine and cysteine. The latter could be explained by methionine in this medium. Effects of media compositions and culture systems should be further studied. According to these results there is an advantage in droplet culture.

---

**Keywords:** *in vitro* fertilization, embryo, culture medium, oxidative stress, thiol

## Sisällys

Alkusanat.....	2
Tiivistelmä.....	3
Abstract.....	4
Lyhenteet.....	6
<b>1. Johdanto.....</b>	<b>7</b>
1.1 Sukusolut ja alkion varhaiskehitys.....	8
1.1.1 Munasolu ja siittiö.....	8
1.1.2 Hedelmöittyminen.....	9
1.1.3 Alkion jakautuminen ja aineenvaihdunta.....	10
1.2 Hedelmöityshoidot.....	11
1.2.1 Hoidon toteutus.....	12
1.2.2 Koeputkihedelmöitys.....	13
1.3 Laboratorio ja soluviljely.....	14
1.3.1 Kaasut ja lämpötila.....	15
1.3.2 Viljelymenetelmät.....	16
1.3.3 Alkioiden pakastus.....	17
1.4 Viljelyliuokset.....	18
1.4.1 Liuosten kehitys.....	18
1.4.2 Energianlähteet.....	21
1.4.3 Proteiinilähteet.....	23
1.5 Alkioiden laatu ja ominaisuudet.....	25
1.5.1 Jakautumisnopeus.....	26
1.5.2 Blastomeerien tasakokoisuus.....	27
1.5.3 Fragmentaatio.....	28
1.5.4 Hoidon vaikutus alkion laatuun.....	29
1.6 Oksidatiivinen stressi.....	30
1.6.1 Reaktiiviset happiyhdisteet.....	30
1.6.2 Tiolit.....	31
1.6.3 Nukleotidit.....	32
1.6.4 Viljelyliuosten antioksidantit.....	33
<b>2. Tutkimuksen tarkoitus.....</b>	<b>35</b>
<b>3. Materiaali ja menetelmät.....</b>	<b>36</b>
3.1 Vertailuryhmät ja liuokset.....	36
3.2 Tioli- ja nukleotidimittaukset.....	40
<b>4. Tulokset.....</b>	<b>43</b>
4.1 Raskaustulokset.....	43
4.2 Alkioiden laatu toisen päivän alkionsiirroissa.....	44
4.3 Alkioiden laatu kolmannen päivän alkionsiirroissa.....	47
4.4 Tioli- ja nukleotidipitoisuudet.....	49
<b>5. Tulosten tarkastelu.....</b>	<b>55</b>
Lähdeluettelo.....	63

## Lyhenteet

ATP	adenosiinitrifosfaatti
DNA	deoksiribonukleiinihappo
DTT	ditiotreitoli
EDTA	etyleenidiamiinitetraetikkahappo
FSH	follikkelia stimuloiva hormoni
GnRH	gonadotropiinia vapauttava hormoni
GSH	glutationi (pelkistynyt)
hCG	human chorionic gonadotrophin (ihmisen istukkahormoni)
HPLC	high-performance liquid chromatography (nestekromatografia)
HSA	ihmisen seerumin albumiini
ICSI	intracytoplasmic sperm injection (siittiön mikroinjektio munasoluun)
IVF	<i>in vitro</i> fertilization (koeputkihedelmöitys)
LH	luteinisoiva hormoni
NAD	nikotiiniamidiadeniininukleotidi
PVP	polyvinyylipyrrolidoni
rFSH	yhdistelmä-DNA -tekniikalla valmistettu follikkelia stimuloiva hormoni
rHA	yhdistelmä-DNA -tekniikalla valmistettu ihmisen albumiini
RNA	ribonukleiinihappo
SSR	seerumin vastine (synthetic serum replacement)

## 1. Johdanto

Ihmisen lisääntyminen on moniin muihin lajeihin verrattuna varsin tehotonta ja haavoittuvaista. Tahaton lapsettomuus on yleinen ongelma, jonka hoitomenetelmät ovat kehittyneet paljon viime vuosina. Erilaisia hedelmöityshoitoja aloitettiin Suomessa yli 8300 vuonna 2004 ja määrä kasvaa vuosittain (STAKES 2006). Koeputkihedelmöitys (*in vitro* fertilization, IVF) on yleinen ja tehokas lapsettomuuden hoitokeino.

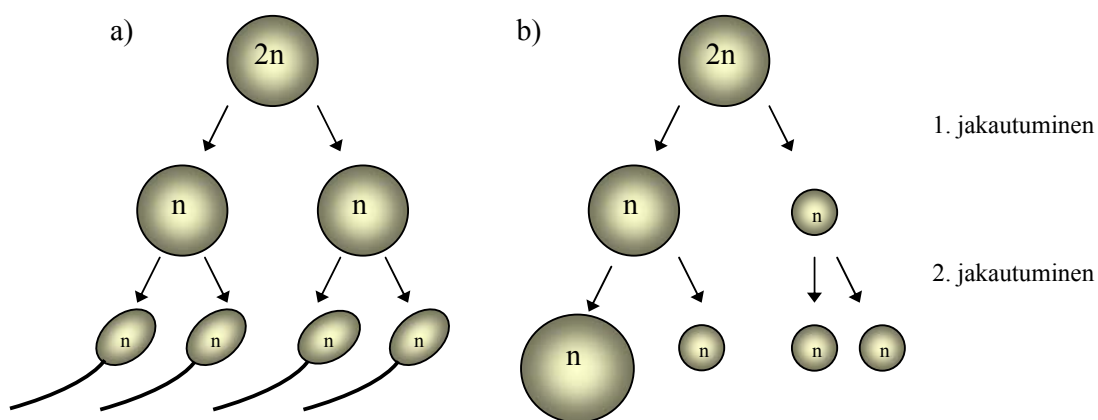
Koeputkihedelmöityksessä alkioiden varhaiskehitys tapahtuu ihmiskehon ulkopuolella. Sukusoluja ja alkioita kasvatetaan soluviljelykaapissa naisen lisääntymiselimestöä mahdollisimman tarkoin vastaavissa fysikaalisissa olosuhteissa. Laboratoriossa alkioihin kohdistuu monenlaista stressiä, jota pyritään vähentämään luonnollisilla, kehitystä tukevilla viljelyliuoksilla. Yksi merkittävimmistä viljelyolosuhteissa vaikuttavista tekijöistä on hapettavien olosuhteiden aiheuttama oksidatiivinen stressi. Sen välttäminen on edelleen haasteena liuosten ja viljelymenetelmien kehittämisessä.

Hedelmöityshoidoissa käytettävät kaupalliset liuokset ovat kehittyneet paljon viime vuosina. Markkinoille tulee jatkuvasti uusia tuotteita, joiden koostumukset ja käyttötarkoitukset vaihtelevat. Liuosten ominaisuuksia ja vaikutuksia hoitotuloksiin tutkitaan jatkuvasti. On kuitenkin vaikea selvittää, mitkä tekijät viljelyssä lopulta vaikuttavat alkioiden laatuun. Hoidon lopputulokseen vaikuttavat alkioiden lisäksi muun muassa potilaan ikä, käytetty lääkitys ja lapsettomuuden syy.

Viljelyliuokset voivat vaikuttaa sukusolujen ja alkioiden kehitykseen ja laatuun monella tavalla. Vaikka alkioiden hyvä laatu ei takaa onnistunutta hoitoa eli raskautta, on se kuitenkin merkittävin yksittäinen raskauden muodostumiseen vaikuttava tekijä. Parhaan alkion valinta on varsinkin yhden alkion siirrossa tärkeää, mutta nykymenetelmillä vielä osin puutteellista. Arviointi perustuu pääasiassa alkion jakautumisnopeuteen ja yleiseen morfologiaan.

## 1.1 Sukusolut ja alkion varhaiskehitys

Ihmisen solussa on 23 vastinkromosomeista muodostuvaa kromosomiparia, yhteensä 46 kromosomia. Sukusolut poikkeavat muista soluista, koska ne muodostuvat meioottisen solunjakautumisen tuloksena. Meioosin aikana solun 46 kromosomia kahdentuvat kerran, solu sen sijaan kaksi kertaa (kuva 1). Näin alkuperäisestä itusolusta syntyy neljä yksinkertaisen kromosomiston (23 kromosomia) sisältävää sukusolua. Naisilla yksi näistä neljästä solusta muodostaa suureksi kasvavan munasolun (läpimitaltaan n. 110  $\mu\text{m}$ ) muiden jäädessä surkastuneiksi poistosoluiksi. Meioosin yhteydessä tapahtuva geneettisen materiaalin vaihto vastinkromosomien kesken tuottaa sukusoluihin uusia alleelien eli geenien eri muotojen yhdistelmiä. Hedelmöitys johtaa perimän ainutlaatuisen uudelleenyhdistymiseen. Samalla munasolun ja siittiön yksinkertaiset kromosomistot yhtyvät alkion täydelliseksi kromosomistoksi.



Kuva 1. Meioottinen solunjakautuminen ja sukusolujen synty. a) Yhdestä esisolusta muodostuu kahden jakautumisen tuloksena neljä siittiötä. b) Munasoluja muodostuu esisolusta vain yksi, muut kolme solua ovat poistosoluja.  $2n$  = kokonainen kromosomisto,  $n$  = yksinkertainen kromosomisto

### 1.1.1 Munasolu ja siittiö

Munasolun kehityksessä ensimmäistä meioottista jakautumista seuraa ensimmäisen poistosolun ilmaantuminen, jolloin munasolun tuma on valmis hedelmöitykseen. Toinen meioottinen jakautuminen kuitenkin pysähtyy ja etenee loppuun vasta munasolun



hedelmöittymisen yhteydessä. Munasolun kehityksen loppuvaiheessa siihen varastoituu alkionkehityksen alkuvaiheessa tarvittavaa deoksiribonukleiinihappoa (DNA), ribonukleiinihappoja (RNA), ravinteita ja proteiineja. Munasolu kehittyy munasarjassa munarakkulan sisällä granuloosasolujen ympäröimänä. Kypsä munasolu irtoaa puhkeavasta munarakkulasta ja siirtyy munanjohtimeen, jossa mahdollinen hedelmöittyminen tapahtuu.

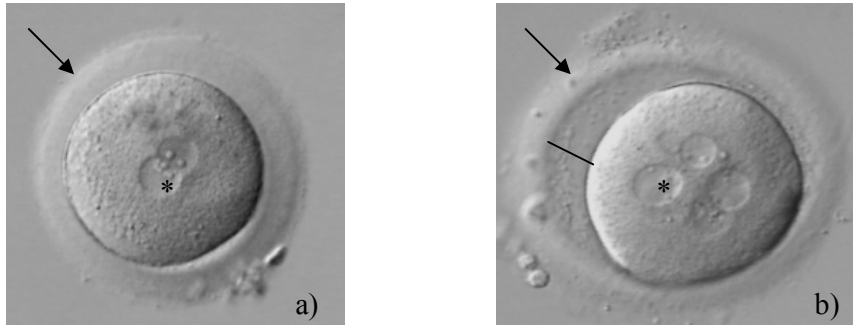
Siittiöiden muodostuessa meioottinen jakautuminen johtaa neljän siittiösolun syntyyn siinä missä munasoluja muodostuu vain yksi. Siittiö kehittyy huomattavasti munasolua pienemmäksi. Munasoluista poiketen siittiöt kehittyvät kromosomistonsa osalta valmiiksi jo kivesten siementiehyissä. Liikkumis- ja hedelmöittämiskykynsä ne tosin saavat vasta kulkeutuessaan siementiehyitä pitkin lisäkiveksiin. Siittiösolun kehittyessä siihen muodostuu siimahäntä ja runsaasti mitokondrioita sisältävä keskikappale, jotka yhdessä mahdollistavat siittiön liikkeen. Kypsän siittiön päässä on perintöaineen lisäksi kärkekappale eli akrosomi, joka sisältää hedelmöittämiseen tarvittavia entsyymejä.

### 1.1.2 Hedelmöittyminen

Munasolua ja alkiota ympäröi varhaisen kehityksen ajan vahva proteiinikalvo, *zona pellucida*. Se koostuu kolmesta eri glykoproteiinityypistä, joista yksi toimii reseptorina siittiöille. Siittiö tunkeutuu *zona pellucidan* läpi akrosomin hydrolyyttisten entsyymien avulla. Hedelmöityksessä siittiön tuma purkautuu munasolun solulimassa. Siittiön tunkeutuminen aktivoi myös munasolun meioosin jatkumisen ja toisen poistosolun erkaantumisen.

Sukusolut muodostavat yhtymisensä jälkeen munasoluun kaksi toisiaan lähestyvää esitumaa. Ne ovat yleensä hyvin näkyvissä ja lähes tasakokoiset, mistä tunnistetaan normaali hedelmöittyminen (kuva 2a). Laboratoriossa osan munasoluista nähdään hedelmöittyvän epänormaalisti, mistä kertoo esitumien kahdesta poikkeava lukumäärä (kuva 2b) tai niiden keskinäinen kokoero. Suurimmassa osassa tapauksista usean esituman syntyminen kertoo usean siittiön tunkeutumisesta munasoluun, toisaalta joskus kyse on munasolun kypsymsajakautumisen häiriöstä (ks. yleiskatsaus Munné & Cohen, 1998).

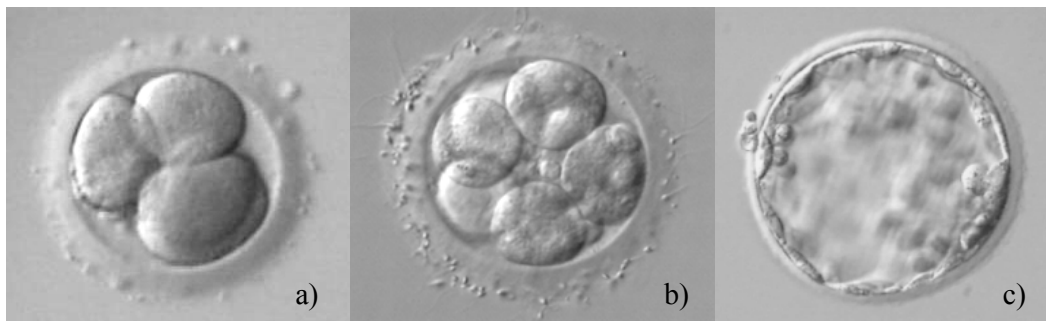
Esitumiin muodostuu tumajyvästen esiasteina tunnettuja kappaleita (nucleolar precursor bodies), jotka usein järjestäytyvät lähelle esitumien yhtymäkohtaa.



Kuva 2. a) Normaalisti hedelmöittynyt munasolu, jonka keskellä näkyy kaksi esitumaa (\*). b) Epänormaalisti hedelmöittynyt munasolu, jossa on nähtävissä kuusi eri kokoista esitumaa ja epätavallisen suuri perivitelliinitila (suora viiva) munasolun ja *zona pellucidan* (nuoli) välissä. (kuvat Väestöliitto 2002)

### 1.1.3 Alkion jakautuminen ja aineenvaihdunta

Hedelmöittynyt munasolu eli tsygootti jatkaa varhaista kehitystään kulkiessaan munanjohdinta pitkin. Noin 12 tuntia hedelmöitymisestä esitumat häviävät näkyvistä ja DNA kahdentuu, mitä seuraa tsygootin jakautuminen kahdeksi alkion soluksi eli blastomeeriksi. Hedelmöitymistä seuraavana päivänä alkiossa on yleensä 2-5 solua. Symmetrisesti 4-soluiseksi jakautunutta alkioita pidetään tässä vaiheessa optimaalisena (kuva 3a). Kolmantena päivänä alkio voi olla 6-10 -soluinen (kuva 3b). Viidenteen päivään mennessä alkio jakautuu noin 32-64 -soluiseksi ja muodostaa onteloisen blastokystin (kuva 3c) kiinnittyäkseen pian tämän jälkeen kohdun limakalvoon.



Kuva 3. Hyvälaatuisia alkioita, joissa vain lievää fragmentaatiota. a) 4 -soluinen alkio (päivä 2), jossa tasakokoiset blastomeerit. b) 8 -soluinen alkio (päivä 3), jonka *zoonaan* on tarttuneena lukuisia siittiöitä. c) Blastokysti kehityspäivänä 5 tai 6. Siinä solut ovat painautuneet nesteen täyttämän ontelon reunoille. Ontelo täyttää kuvassa suurimman osan alkioista. (kuvat Väestöliitto 2002)

Varhaisen alkion solut jakautuvat puoliintumalla, joten alkion tilavuus ei silloin vielä suurene. Aluksi solut ovat toisistaan melko erillään ja toimivat itsenäisesti, mutta neljännen päivän jälkeen alkio kompaktoiduu ja solut alkavat toimia yhtenäisemmin. Siksi alkio on herkempi ympäristön vaikutuksille ennen kompaktoitumista (ks. yleiskatsaus Gardner ym., 2002). *In vivo* alkio saavuttaa kohdun kompaktoitumisen jälkeen neljäntenä tai viidentenä päivänä hedelmöitymisestä. Kompaktoituneesta alkiosta tulee tiivis solurypäs eli morula, sitten nesteontelon sisältävä blastokysti. Ontelonmuodostusta seuraa blastokystivaiheisen alkion tunkeutuminen ulos *zona pellucida* -kuoresta, jolloin alkio pääsee kiinnittymään kohdun limakalvoon.

Alkion metabolia, kuten energia-aineenvaihdunta ja aminohappojen käyttö, muuttuu sen kehityksen aikana. Ensimmäiset 3-4 vuorokautta alkio saa energiansa pääasiassa pyruvaatista, kompaktoitumisen jälkeen sen sijaan enimmäkseen glukoosista glykolyysillä ja hapetusreaktioilla. Munanjohtimen olosuhteet, kuten energianlähteiden, aminohappojen ja hapen pitoisuudet, vastaavat alkion vaiheittain muuttuvia tarpeita.

Metabolia on hidasta kompaktoitumiseen saakka, joka tapahtuu noin neljäntenä päivänä hedelmöityksestä, kun alkio on yli 8-soluinen. Alkion solut toimivat aluksi munasolun lähetti-RNA:n ja proteiinien varassa. Vasta kompaktion jälkeen alkion oma genomi aktivoituu, mikä vaikuttaa sen metaboliaan kiihdyttävästi, ja proteiinien tuotto lisääntyy (ks. yleiskatsaus Gardner, 1998b).

## 1.2 Hedelmöityshoidot

Naisilla yleisimpiä hedelmättömyyden syitä ovat endometrioosi, kohtuontelon viat, munanjohtimiin liittyvät sairaudet ja hormonihäiriöt. Miehillä hedelmättömyyden takana on useimmiten sperman laadun heikentyminen: siittiöiden vähyys, epänormaalien siittiöiden suuri osuus tai huono liikkuvuus. Lapsettomuushoitoihin tulleilta pareilta (sekä miehiltä että naisilta) on löydetty enemmän kromosomimuutoksia kuin väestöstä keskimäärin, mikä saattaa joissakin tapauksissa olla syynä lapsettomuuteen (Clementini ym., 2005).

Hedelmöityshoitoja pyritään jatkuvasti kehittämään turvallisemmiksi sekä potilaille että syntyville lapsille. Merkittävin hedelmöityshoitoihin liittyvä riskitekijä on monisikiöraskaus, joka voi aiheuttaa terveysongelmia sekä äidille että lapsille. Erityisesti Suomessa monisikiöraskauksien määrä on vähentynyt, koska yhä useammassa hoidossa potilaalle siirretään yksi tai korkeintaan kaksi alkioita. Vuonna 2005 jo puolessa IVF -hoidoista siirrettiin vain yksi alkio (STAKES 2006). Raskauden alkamiseen vaikuttaa myös siirrettävän alkion laatu; hyvällä alkiolla raskauden todennäköisyys paranee (Vilksa ym., 1999). IVF -hoidon jälkeen raskaus alkaa noin joka kolmannella potilaalla.

### **1.2.1 Hoidon toteutus**

Naisen munasarjoissa alkaa joka kuukausi kehittyä useita munasolun sisältäviä munarakkuloita. Hormonitoiminnan vaikutuksesta vain yksi munasoluista valikoituu muiden tuhoutuessa apoptoottisen solukuoleman kautta. Aivolisäkkeen etulohkon vapauttama follikkeliä stimuloiva hormoni (FSH) stimuloi munarakkuloiden ja munasolujen kypsymistä. Koeputkihedelmöityshoitoja varten munasarjoja stimuloidaan niin, että useampi munasolu jatkaa kehitystään. Munasolujen kypsyttämiseksi potilaalle annetaan hormonilääkitys. Naisen omaa hormonitoimintaa vaimennetaan ensin gonadotropiinia vapauttavan hormonin (GnRH) agonistilla tai antagonistilla. Ne estävät FSH ja LH:n (luteinisoiva hormoni) erityksen. Vaimennuksen jälkeen munasarjat aktivoidaan FSH:lla tuottamaan useita munarakkuloita. Nykyään käytössä on yleensä yhdistelmä-DNA-tekniikalla valmistettu FSH (rFSH) aiemmin naisen virtsasta eristetyn FSH:n sijaan. Joidenkin tutkimusten mukaan rFSH stimuloi munasarjoja puhdistettua FSH:ta tehokkaammin tuottamaan munasoluja (Schats ym., 2000). Tällöin saadaan enemmän kypsiä munasoluja ja paremman laatuista alkioita johtuen mahdollisesti munasolujen paremmasta laadusta (Racowsky ym., 2005). Näin ollen rFSH saattaa lisätä raskauden alkamisen todennäköisyyttä (Daya & Gunby 1999).

Kun munarakkulat ovat riittävän suuria, suurimmat läpimitaltaan noin 17-18 mm, potilaalle annetaan irroituspistos, jonka vaikuttava aine istukkagonadotropiini (hCG, human chorionic gonadotrophin) saa aikaan munasolujen lopullisen kypsymisen ja irtoamisen munarakkulan nesteeseen. Munarakkuloita kehittyy useimmiten kahdesta

kahteenkymmeneen. Niiden sisältämä neste ja munasolut kerätään talteen koeputkiin neulan ja kevyen imun avulla.

### 1.2.2 Koeputkihedelmöitys

Tavallisimmassa menetelmässä, koeputkihedelmöityksessä (IVF), viljelymaljalle pipetoidaan gradientti- ja/ tai swim up -pesulla pestyjä siittiöitä, ja hedelmöittyminen tapahtuu kuten *in vivo*. Tätä menetelmää käytetään, jos siemennesteestä saadaan eroteltua riittävä määrä liikkuvia, morfologialtaan normaaleja siittiöitä. Siemennesteen gradienttipesussa eläviä siittiöitä erotellaan kuolleista siittiöistä ja siemenplasmasta sentrifugoimalla. Swim-up -pesussa saadaan talteen koeputkessa ylöspäin uivat, parhaiten liikkuvat siittiöt. Siittiöitä arvioitaessa tutkitaan niiden määrä, morfologia ja liikkeen laatu sekä mahdollinen valkosolujen ja siittiövasta-aineiden esiintyminen. Arvion perusteella edetään IVF- tai mikrohedelmöityshoitoon. Mikrohedelmöityksessä (ICSI, intracytoplasmic sperm injection) yksi valikoitu siittiö viedään ohuella lasisella pipetillä (mikropipetti) kuhunkin kypsään munasoluun. Mikroinjektio tehdään yleensä silloin, kun siittiöitä on hyvin vähän tai ne ovat heikkolaatuisia. Tällöin muutamankin elävän siittiön löytyminen näytteestä saattaa riittää kerättyjen munasolujen hedelmöittämiseen. ICSI tehdään lämmitetyn mikroskooppitason ja hienosäädetyin mikromanipulaattorin avulla viljelypizaroissa, jotka on peitetty paraffiniöljyllä. Yleensä maljalla käytetään siittiöiden liikettä hidastavaa polymeeriä kuten PVP (polyvinyylipyrrolidone).

Normaali hedelmöittyminen edellyttää kypsiä ja normaaleja sulusoluja. Siittiöt ovat siemennesteestä eroteltuina normaalisti kypsiä, mutta osa voi olla liikkumattomia tai epänormaaleja. Sen sijaan osa punktiossa kerättyistä munasoluista on usein epäkypsiä, eivätkä ne silloin yleensä hedelmöity IVF:ssä. ICSI -hoidossa munasolut kuoritaan ympäröivästä solukosta, joten niiden kypsyys nähdään ensimmäisen poistosolun perusteella ja epäkypsät solut jätetään injektioimatta. IVF:ssä kerättyjen munasolujen kypsyyttä voi arvioida munasolua ympäröivän, pilvimäisen kumulus- ja koronasolukon perusteella. Kypsässä munasolussa nämä solukerrokset ovat laajentuneet kun taas epäkypsää munasolua ympäröi tiivis solukerros. Tällaiseen havaintoon perustuva arvio ei

käytännössä ole luotettava; munasolu ja kumulussolukko saattavat hormonihoidon vuoksi kypsyä eriaikaisesti (ks. yleiskatsaus Ebner ym., 2003).

Munasolun kypsyessä munarakkulan tilavuus kasvaa. Sen koko on yhteydessä munasolun kypsytyteen ja hedelmöittymiskykyyn. Munasolujen hedelmöittymisen ja alkioiden jakautumisen on todettu olevan parempi munarakkulan tilavuuden kasvaessa (Wittmaack ym., 1994). Salha ym. (1998) ovat raportoineet munarakkulan pienen tilavuuden ( $\leq 1$  ml) ennustavan huonompaa hedelmöittymistä verrattuna suurempiin rakkuloihin, mutta ei alkioiden jakautumista tai raskaustuloksia.

Laboratorio ei voi koskaan täysin korvata alkion luonnollisia olosuhteita. IVF:ssä vain osa tsygooteista kehittyä alkioiksi ja niiden laatu vaihtelee. Alkiot jakautuvat yleensä eri tahtiin samallakin potilaalla. Tähän voivat vaikuttaa sukusolujen laatu ja viljelyolosuhteet. Alkioita viljellään useimmiten munasolujen keräys- ja hedelmöittämissäpäivästä laskettuna kaksi tai kolme vuorokautta ennen siirtoa potilaan kohtuun. Vaihtoehtoisesti niitä voidaan viljellä viisi tai kuusi päivää, jolloin osa alkioista saavuttaa blastokystivaiheen. Blastokystiviljelyssä alkionkehitystä voidaan seurata pitemmälle ja lisätä alkioihin kohdistuvaa valintaa.

### **1.3 Laboratorio ja soluviljely**

IVF-hoidoissa pyritään tuottamaan sukusoluista naisen kehon ulkopuolella elin- ja kehityskykyisiä alkioita käyttämällä niiden luonnollista ympäristöä muistuttavia viljelyolosuhteita. Teknisten menetelmien lisäksi viljelyn aikana mahdollisesti muuttuvia tekijöitä ovat viljelyliuoksen koostumus ja pH, soluviljelykaapin kaasuseos, lämpötila ja kosteus.

### 1.3.1 Kaasut ja lämpötila

Viljelykaapin lämpötila on yleensä 37 °C ja se kosteutetaan yleensä kaapin pohjalle lisätyn steriilin veden avulla. Kun soluja käsitellään viljelykaappien ulkopuolella voidaan käyttää lämpölevyä, mutta tästä huolimatta pienikin viileneminen voi aiheuttaa ongelmia. Meioottinen tumasukkula muodostuu dynaamisista mikrotubuluksista ja on herkkä lämpötilan muutoksille. Viileneminen voi vaurioittaa tumasukkulaa pysyvästi tai se voi palautua kokonaan tai osittain. 10 minuutin viilentäminen 33 °C :een saa aikaan tumasukkulan palautuvan purkautumisen, mutta 28 °C :ssa enää osa sukkuloista palautuu (Wang ym., 2001). Vaurioitunut tumasukkula voi aiheuttaa epänormaalin hedelmöittymisen tai häiriöitä kromosomien jakautumisessa tytärsolujen kesken.

Viljelyliuoksissa on sopivaa pH-arvoa ylläpitävä, yleensä bikarbonaatin ja hiilidioksidin suhteelle perustuva puskuri. Liuosten valmistajilla on suositus hiilidioksidipitoisuudelle, jolla varmistetaan oikea pH kussakin liuoksessa. Näin ollen soluviljelykaappien kaasuseos sisältää yleensä hiilidioksidia 5-6 %. ICSI:ssä solujen käsittely huoneilman pienessä hiilidioksidipitoisuudessa vaatii hiilidioksidista riippumattoman puskurin käyttöä.

Happi on korkeina pitoisuuksina soluille haitallinen molekyyli. Sen pitoisuus elimistössä on merkittävästi pienempi kuin viljelyolosuhteissa. Munanjohtimessa vallitseva hapen osapaine on arviolta neljäsosa ilmakehän hapestä, mikä vastaisi liuoksessa noin 5 %:n pitoisuutta. Soluviljelykaapeissa happea on useimmiten 20 % kuten ilmakehässä. Useiden tutkimusten mukaan happipitoisuuden pienentäminen viljelykaapeissa edistää hiiren (Gardner & Lane 1996), sian (Kitagawa ym., 2004) ja ihmisen alkioiden kasvua ja vähentää happiradikaalien muodostumista (ks. yleiskatsaukset Guérin ym., 2001; Burton ym., 2002). Myös Petersen ym. (2005a) raportoivat ihmisen pakastettujen alkioiden kehittyvän sulatuksen jälkeen paremmin blastokystivaiheeseen 5 %:n kuin 20 %:n happipitoisuudessa. Toisaalta osassa tutkimuksia happipitoisuudesta johtuvia eroja ei ole havaittu tai ne ovat olleet pieniä (Dumoulin ym., 1999; Bahceci ym., 2005). Näissä tutkimuksissa ei havaittu merkitseviä eroja 5 %:n ja 20 %:n happipitoisuuksien välillä koskien alkionkehitystä kolmanteen päivään ja raskaustuloksia. Molemmissa pitoisuuksissa saadaan kehittymään hyviä alkioita. Pienemmän happipitoisuuden hyöty

saattaisi toisaalta ilmetä vasta viljelyä myöhemmässä kehitysvaiheessa. Happipitoisuuden vähentämisen viljelyolosuhteissa lähelle elimistön tasoa voi silti arvioida olevan alkioille edullista.

### 1.3.2 Viljelymenetelmät

Munasoluja ja alkioita voidaan viljellä kannellisilla muovimaljoilla joko avoviljelynä noin 500 µl:n nestetilavuudessa tai 20-50 µl:n pisaroissa mineraaliöljyllä peitettynä. Öljy voi suojata liuoksessa olevia alkioita keräämällä itseensä haitallisia yhdisteitä tai hiukkasia ja vähentämällä hapen haittoja. Öljy myös estää liuoksen haihtumista ja siis osmoottisia ja pH:n muutoksia. McKiernan ja Bavister (1990) raportoivat hamsterin alkoiden kehittyvän pitemmälle öljyllä peitetyissä pisaroissa verrattuna viljelyyn avomaljalla. Sama vaikutus oli 5 %:n tai 10 %:n happipitoisuudella verrattuna 19 %:n pitoisuuteen. Öljykerros ei vaikuttanut liuoksen osmolaarisuuteen, mutta sen arvioitiin hyödyttävän alkioita pienentämällä liuoksen happipitoisuutta (McKiernan & Bavister 1990). Samoin Fukui ym. (1996) havaitsivat suuremman osan naudan alkioista kehittyvän blastokystivaiheeseen pisara- kuin avomaljaviljelyssä.

Liuostilavuus ja yhdessä viljeltävien alkoiden määrä voivat vaikuttaa alkoiden olosuhteisiin viljelyn aikana. Öljyllä peitetyissä pisaroissa nestetilavuus on huomattavasti pienempi kuin avomaljalla ja siten myös alkoiden määrä yleensä pienempi. Pieni alkionäärä pisaraa kohti helpottaa niiden tarkastelua ja vähentää liuoksen tarvetta. Alkion solut luultavasti myös itse tuottavat niiden elinkykyä edistäviä kasvutekijöitä. Nämä auto- ja parakriinisesti vaikuttavat tekijät ovat hiirikokeiden mukaan välttämättömiä alkionkehitykselle *in vitro* erityisesti kahden ensimmäisen viljelypäivän ajan, vaikuttamatta kuitenkaan solunjakautumisten ajankohtaan (O'Neill 1998). Pieni määrä alkioita suuressa tilavuudessa voi aiheuttaa kasvutekijöiden liiallisen laimenemisen. Toisaalta ammoniakki ja osa muista aineenvaihduntatuotteista ovat alkioille haitallisia.

Suuri alkioitiheys pienessä liuostilavuudessa on havaittu hyödylliseksi hiiren alkoiden jakautumiselle ja kehittymiselle blastokystivaiheeseen. Vaikutus alkioihin oli suurin ensimmäiset 48 tuntia, koska 2-soluvaiheessa autokriinisten tekijöiden merkitys alkion



selviytymiselle on tärkeintä (O'Neill 1998). Rijnders ja Jansen (1999) tutkivat ihmisalkioiden viljelyä kolmannelta päivästä blastokystiksi, jolloin liuostilavuudella ja alkioitiheydellä ei ollut vaikutusta kehitykseen. Näiden tekijöiden vaikutus voisi olla suurin kaksi- ja nelisoluvaiheessa vähentyen huomattavasti sen jälkeen. Toisaalta eräässä pizaraviljelyä koskeneessa tutkimuksessa ei havaittu alkioitiheyden vaikutusta raskaustuloksiin viljeltäessä toiseen päivään 1 tai 3-5 alkioita pisaraa kohti (Spyropoulou ym., 1999). Ihmisen ja hiiren alkioiden välillä saattaa olla tässä lajityypillinen ero. Uudemmassa vertailussa pizaraviljely johti useamman raskauden alkamiseen kuin avoviljely, vaikka alkioiden laadussa ei ollut eroa (Petersen ym., 2005b). Alkioita viljeltiin ICSI:n jälkeen kolmanteen päivään saakka avoviljelyssä (1 ml maljalla) ja 50 µl pisaroissa öljyn alla. Pienen liuostilavuuden ja pizaraviljelyn hyödyistä on siis näyttöä ennen kolmatta viljelypäivää, mutta ei sen jälkeen. Alkioiden määrällä pisarassa ei ole yhtä suurta merkitystä. Pizaraviljelyssä sekä liuoksen peittävä öljy että pieni liuostilavuus saattavat olla hyödyksi alkion selviytymiselle ja kehitykselle.

### **1.3.3 Alkioiden pakastus**

Alkioiden pakastaminen myöhempää käyttöä varten vähentää tarvetta siirtää useita alkioita kerralla. Pakastettujen alkioiden siirto lisää raskauden alkamisen todennäköisyyttä hoitokertaa kohti, vaikka tuorealkionsiirrossa raskauden alkamisen todennäköisyys onkin suurempi (Ubaldi ym., 2004). Alkioiden selviäminen pakastus- ja sulatusprosessista riippuu laadun lisäksi niiden kehitysvaiheesta pakastushetkellä. Mitä myöhäisempi päivä hedelmöityksestä ja mitä enemmän soluja alkiossa on, sitä pienempi osa alkioista selviytyy (Salumets ym., 2003b). Aikaisemmassa vaiheessa alkioilla on vähemmän solupinta-alaa, mikä voi vähentää pakastuksen haittoja solukalvoille. Tsygoottien parempaa selviytymistä voi selittää myös se, että esitumat eivät yleensä pakastettaessa ole vielä yhdistyneet, eikä niissä silloin ole jakautuvan solun tumasukkulaa, jota pakastaminen vaurioittaisi. Pakastukseen ja sulatukseen on kehitetty erityisiä liuoksia, joiden sisältämät kylmänsuoja-aineet suojaavat alkioita pakastus- ja sulatusolosuhteissa. Usein nämä ovat sakkaroosi ja 1,2 -propanidioli, jotka valmistavat alkiot jäätymiseen vähentämällä niiden vesipitoisuutta ja estämällä suurten jääkiteiden muodostumisen. Usein käytetään menetelmää, jossa alkiot

vedetään sakkaroosiliuoksessa ruiskun avulla muovioolkiin, jäädytetään hitaasti portaittain ja säilytetään nestetyössä (-196 °C).

## **1.4 Viljelyliuokset**

Soluviljelyliuokset ovat fysiologisia suolaliuoksia, joihin on lisätty hiilihydraatteja, aminohappoja ja yleensä ihmisen seerumin albumiinia. Ne eroavat toisistaan enimmäkseen glukoosin ja sen johdannaisten, aminohappojen, vitamiinien ja antibioottien laadun ja pitoisuuksien suhteen. Erityisen haastavaa on selvittää, mikä aine liuoksessa saa aikaan mahdollisen eron toiseen liuokseen verrattuna. Kaupallisten liuosten valmistajat usein ilmoittavat liuosten koostumuksesta ja aineiden pitoisuuksista puutteellisesti.

### **1.4.1 Liuosten kehitys**

Ensimmäiset alkioviljelyliuokset olivat yksinkertaisia glukoosilla ja seerumilla täydennettyjä suolaliuoksia. Nämä liuokset kehitettiin somaattisten solujen viljelyyn, ennen IVF -hoitojen kehittymistä, eikä niissä ole otettu huomioon sukusolujen ja alkuiden erityisvaatimuksia. Myöhemmin ymmärrettiin aminohappojen ja pyruvaatin merkitys, ja uudemmat liuokset olivatkin selvästi monimuotoisempia sisältäen aminohappoja, koentsyymejä ja vitamiineja. Monenlaisilla liuostyypeillä saatiin ihmisen munasoluja hedelmöittämään ja jakautumaan ja yksinkertaisen liuoksen ajateltiin olevan riittävä (ks. yleiskatsaus Mehta, 2001). Nykyään tiedetään enemmän alkion metaboliasta ja liuosten sisältämien aineiden vaikutuksista. Munanjohtimen eritteiden koostumuksen tutkiminen on hyödyttänyt IVF -viljelyliuosten kehitystä. Kohdunpoiston yhteydessä Tay ym. (1997) mittasivat naisten munanjohtimista glukoosin, laktaatin, pyruvaatin ja aminohappojen pitoisuuksia. Arginiini,alaniini ja glutamaatti olivat runsaimmat aminohapot munanjohtimissa.

Blastokystivaiheen saavuttamiseksi IVF:ssä on liuoksia ollut välttämätöntä kehittää paremmin alkion kehitysvaiheita mukaileviksi. Nykyään moni alkio saadaan kehittämään

blastokystivaiheeseen, jolloin raskauksiakin alkaa enemmän siirtoa kohti, jopa kaksinkertaisesti verrattuna kolmen päivän ikäisten alkioiden siirtoihin (Gardner ym., 1998a).

Osalla valmistajista on liuoksia jokaista työvaihetta ja alkionkehityksen vaihetta varten. Toista ääriäitää edustaa liuos, joka on yksinään tarkoitettu tukemaan alkion kehitystä koko viljelyn ajan eli blastokystiksi asti. Periaatteessa tällainen liuos, kuten Global (Lifeglobal) riittää alkion viljelyyn blastokystivaiheeseen saakka. Yleensä alkioiden pitkään viljelyyn käytetään sarjaa erilaisia liuoksia, jotta ne mukailisivat alkioiden muuttuvia tarpeita, esimerkkeinä Vitrolife GIII sarjan G-1/G-2 ja MediCult ISM1/2.

Ainesosien vaikutuksia on tutkittu muuttamalla niiden pitoisuuksia parhaan vasteen löytämiseksi. Toisaalta yhden aineen vaikutus voikin riippua toisen pitoisuudesta (ks. yleiskatsaus Summers & Biggers, 2003). Luonnollisten olosuhteiden jäljitteleminen ja toisaalta erilaisten aineyhdistelmien kokeileminen parhaan vasteen löytämiseksi ovat johtaneet hyvien liuosten syntyyn ja sen myötä viljeltyjen alkioiden kehityksen ja hoitotulosten paranemiseen.

Osassa liuoksia on uusia ainesosia, joiden toivotaan hyödyttävän alkion turvallista kehitystä laboratorio-olosuhteissa. Tällaisia ovat esimerkiksi hyaluroonaani, alanyyliglutamiini, metioniini, vitamiinit ja EDTA (etyleenidiamiini-tetraetikkahappo). EDTA on kelaattori eli se sitoo metalli-ioneja, joita voi olla pieniä määriä viljelyolosuhteissa. Sitomalla rautaa se toimii antioksidanttina vähentämällä happiradikaalien syntymistä liuoksessa ja estämällä lipidien hapettumista. EDTA edistää hiiren alkioiden kehittymistä blastokystivaiheeseen, kun sitä on läsnä viljelyliuoksessa ensimmäiset 48h, minkä jälkeen se on kehitykselle haitallista (Gardner & Lane, 1996). EDTA:a on nykyään useassa kaupallisessa liuoksessa, myös tässä tutkimuksessa käytetyssä G-1 -liuoksessa (Vitrolife). EDTA:a ei ole alkion luonnollisessa ympäristössä, mutta se saattaa osaltaan korvata laboratoriosta puuttuvia elimistön suojaimekanismeja haitallisia aineita vastaan.

Moniin liuoksiin lisätään pH -muutosten ilmaisijana toimivaa fenolipunaa, mutta sillä on epäilty olevan mm. samanlaisia haitallisia vaikutuksia kuin raskasmetalleilla ja estrogeenin kaltaista aktiivisuutta estrogeeniherkille soluille (Grady ym., 1991). Toisaalta fenolipuna on onnistuttu myös puhdistamaan kontaminanteista. Joistakin kaupallisista liuoksista fenolipuna on jätetty pois.

Hyaluronihappo eli hyaluronaani on erittäin suurikokoinen lineaarinen polysakkaridi, glykosaminoglykaani. Sitä on runsaasti munanjohtimen ja kohdun eritteissä. Alunperin hyaluronaania kokeiltiin korvaamaan seerumin albumiini viljelyliuoksissa, mutta alkionsiirtoliuokseen lisättyinä sen huomattiin edistävän alkion kiinnittymistä kohdun limakalvoon (Gardner ym., 1999). Hyaluronaania on MediCult:n uudessa alkionsiirtoliuoksessa (UTM) natriumin suolana ja osassa Vitrolife:n GIII -sarjan liuoksia, erityisesti alkionsiirtoliuoksessa (Embryo Glue), mutta myös alkioviljelyliuoksissa G-1 ja G-2. Suurikokoisena ja elimistön pH:ssa ionimuotoisena polysakkaridina se muodostaa erittäin viskoosia liuosta sitomalla vettä. Hyaluronaanin vaikutus voi olla siinä, että viskoosi liuos käyttäytyy paremmin kohdussa. Vaikutus voi myös perustua alkion sitoutumiseen kohdun limakalvoon hyaluronaanin avulla.

Mikrobikontaminaatioiden välttämiseksi alkioviljelyliuoksiin on lisättävä antibiootteja. Näistä yleisimmin käytetty on penisilliini, muita ovat streptomysiini ja gentamisiini. Vitrolife:n GIII -sarjan liuoksissa on vain penisilliiniä. MediCult:n liuoksissa (Universal IVF, ISM1, UTM) on sekä penisilliiniä ja streptomysiiniä, uudemmissa hieman vähemmän. Antibiooteilla on havaittu olevan alkioille haitallisia vaikutuksia, mikä näkyy kehityksen hidastumisena. Streptomysiinin ja penisilliinin vaikutukseen keskittyneessä tutkimuksessa huomattiin, että alkiot jakautuivat nopeammin, kun liuoksessa ei ollut lainkaan näitä antibiootteja (Magli ym., 1996). Haitallisia vaikutuksia epäiltiin olevan erityisesti streptomysiinillä, koska se vaikuttaa proteiinisynteesiin. Antibioottien pitoisuudet pyritään pitämään tarpeeksi pieninä, jotta toksisilta vaikutuksilta vältyttäisiin.

B-vitamiinit (tiamiini B1, riboflaviini B2, pyridoksiini B6) on todettu hyödyllisiksi hiiren alkioiden kehitykselle (Lane & Gardner, 1998). Vaikutus perustuu muun muassa niiden kykyyn säädellä glykolyysiä ja hapetus-pelkistysreaktioita solussa. Vitamiineja B1, B2 ja

B6 on lisätty Vitrolife G-2 -liuokseen, joka on tarkoitettu viljelyyn kolmannelta kehityspäivästä blastokystivaiheeseen. Tässä vertailussa Vitrolife:n G-2 -liuosta on käytetty alkionsiirtoliuoksena.

### 1.4.2 Energianlähteet

Glukoosin, laktaatin ja pyruvaatin pitoisuuksia on mitattu vuosien mittaan eri menetelmin ihmisen munarakkuloista, munanjohtimista ja kohdusta. 1960 -luvun lopussa laktaatti ja pyruvaatti todettiin välttämättömiksi alkion kehitykselle (ks. yleiskatsaus Summers & Biggers, 2003). Nykyään pyruvaatti on alkioiden viljelyliuosten olennainen ainesosa. Glukoosin ja muiden hiilihydraattien pitoisuudet vaihtelevat liuoksissa käyttötarkoituksen mukaan.

Gardner ym. (1996) tekivät määryksiä munanjohtimen ja kohdun eritteistä kierron keskivaiheilla, jolloin hedelmöittyminen ja alkion varhaiskehitys tapahtuvat *in vivo* (taulukko I). Pyruvaatin ja laktaatin pitoisuudet olivat suurimmillaan munanjohtimissa, glukoosin taas kohdussa. Lisäksi glukoosin pitoisuus vaihteli munanjohtimissa kuukautiskierron vaiheiden mukaan. Munasolun irtoamisen aikaan glukoosia oli huomattavasti vähemmän (0,5 mM) kuin munarakkulan kasvuvaiheessa (3,1 mM). Näin ollen glukoosipitoisuus vastaa munasolun ja siitä kehittyvän alkion tarpeita.

Taulukko I. Alkion hyödyntämien hiilihydraattien pitoisuudet munanjohtimissa ja kohdussa (Gardner ym. 1996).

	Munanjohdin	Kohtu
Pyruvaatti	0,24 mM	0,10 mM
Laktaatti	10,5 mM	5,87 mM
Glukoosi	0,50 mM	3,15 mM

Alkion tärkein energianlähde on aluksi pyruvaatti, jonka ohella se voi hyödyntää laktaattia ja aminohappoja, mutta glukoosin käyttö on rajoittunutta. Sen sijaan 8-soluisesta alkioista alkaen glukoosi on tärkeä energianlähde (ks. yleiskatsaus Gardner 1998b). Aikaisen

vaiheen viljelyliuoksissa on yleensä enemmän pyruvaattia ja vähemmän glukoosia. Viljelyn jatkuessa kolmannesta päivästä eteenpäin liuoksissa on enemmän glukoosia.

Liuosten hiilihydraattipitoisuudet ovat usein suurempia kuin tutkimusten mukaiset pitoisuudet elimistössä. Universal IVF -liuoksessa (MediCult) glukoosia on 5,2 millimoolia litrassa (mM), Na -pyruvaattia 0,88 mM, laktaattia ei lainkaan. Eräs täysin glukoosivapaista liuoksista, P1 Medium (Irvine Scientific), on tarkoitettu viljelyyn kolmanteen päivään saakka. Valmistaja ilmoittaa sen sisältävän Na -pyruvaattia 0,33 mM ja Na -laktaattia 21,4 mM.

Glukoosin on epäilty estävän alkuvaiheen alkionkehitystä. Fosfaatti on osallisena glukoosin pilkkomisessa glykolyysissä ja se vaikuttaa alkioihin glukoosin kanssa viljelyliuokseen lisättynä. Kun glukoosin oli epäilty haittaavan alkion kehittymistä *in vitro*, tehtiin joistakin liuoksista uusia versioita, joista poistettiin glukoosi ja fosfaatti ja lisättiin EDTAa ja glutamiinia. Suositus glukoosin pitoisuudeksi on 2,0-3,0 mM (ks. yleiskatsaus Summers & Biggers, 2003). Glukoosi- ja fosfaattivapaalla liuoksella on saatu paremmat hoitotulokset siirrettäessä potilaille kahden päivän ikäisiä alkioita (Summers-Chase ym., 2004). Glukoosin ja fosfaatin merkitystä tutkimuksissa on myös epäilty, koska joissain tutkimuksissa muut aineet glukoosin ohella ovat voineet vaikuttaa tuloksiin (ks. yleiskatsaus de Silva, 1998). Glukoosi lisää siittiöiden kykyä tarttua munasoluun ja on tärkeää myös munasolua ympäröiville, glukoosia hyödyntäville kumulussoluille (Gardner ym., 1996; Mahadevan ym., 1997). Tästä syystä glukoosi voisi olla hyödyllisempää hedelmöitykselle IVF:ssä kuin mikrohedelmöityksessä.

Glukoosi edistää IVF:ssä siittiöiden liikettä lisäämällä niissä adenosiinitrifosfaatin (ATP) tuotantoa (Williams & Ford, 2001). Hiirellä glukoosi on välttämätöntä siittiön tunkeutumiseksi munasoluun (Sakkas ym., 1993; Urner & Sakkas, 1996). Vaikka osassa liuoksia glukoosipitoisuutta on vähennetty, pidetään glukoosia luonnollisena ainesosana erityisesti liuoksissa, joita käytetään hedelmöittämissivaiheessa ja alkioille kolmannesta kehityspäivästä lähtien.

### 1.4.3 Proteiinilähteet

Aminohapot ovat alkion sekä proteiinisynteesin raaka-aine että energianlähde ja ne toimivat puskureina pH:n muutoksia vastaan. Alkion solukalvossa on aminohappojen kuljetuskanavia, joiden toiminta vaikuttaa myös solun sisäiseen pH -arvoon. Edwards ym. (1998) havaitsivat aminohappojen puskuroivan vaikutuksen hiiren aikaisen vaiheen alkioissa. Paras puskuroiva vaikutus oli ei-välttämättömillä aminohapoilla ja glutamiinilla 4-soluvaiheeseen saakka. 8-soluisilla alkioilla aminohapot eivät enää toimineet pH:n säätelyssä. Ilmeisesti tämä johtui solukalvon kuljetusmekanismien muuttumisesta alkion kompaktoitumassa. Kompaktoitumisen jälkeen alkio kykenee paremmin säätelemään solunsisäistä pH:ta (Edwards ym., 1998).

Ei-välttämättömiksi luokiteltuja aminohappoja on munanjohtimessa enemmän kuin välttämättömiä. Alkuvaiheen alkionkehityksessä eli hedelmöityneestä munasolusta 8-soluvaiheeseen saakka ei-välttämättömät aminohapot ovat hyödyllisiä. Myöhemmässä kehityksessä sen sijaan tarvitaan lisäksi välttämättömiä aminohappoja. Runsaimmat aminohapot munanjohtimessa ovat ei-välttämättömistä aminohapoista erityisesti glutamaatti ja alaniini sekä välttämätön aminohappo arginiini (Tay ym., 1997). Lane ym. (2001) raportoivat, että hiiren alkiot kehittyvät parhaiten liuoksessa, joka sisältää ei-välttämättömät aminohapot ja vain pienen määrän välttämättömiä aminohappoja. Aminohappojen sitoutumiskyky kuljetusproteiineihin vaihtelee, minkä vuoksi myös niiden suhteelliset pitoisuudet ovat liuoksissa olennaisia.

Aminohappojen hajotessa syntyy soluille haitallista ammoniakkia, joka hidastaa alkoiden kehitystä. Gardner ja Lane (1993) havaitsivat, että aminohappoja sisältävässä liuoksessa ammoniakin määrä kasvaa lineaarisesti. He raportoivat ammoniakin kertymisen viljelyn aikana olevan samalla tasolla öljykerroksella peitetyissä pisaroissa kuin viljelyssä avomaljalla. Vaikutus näkyy energiametabolian vääristymisenä ja sitä seuraavana solumäärien pienentymisenä hiiren alkioilla blastokystivaiheessa (Lane & Gardner 2003).

Glutamiini on liuoksessa tärkeä aminoryhmien siirtäjä ja osmoottisen tasapainon säätelijä, jota voi olla liuoksessa muita aminohappoja runsaammin. Glutamiinin on havaittu

edistävän pyruvaatin käyttöä ihmisen alkioissa sekä edistävän niiden kehitystä blastokystivaiheeseen pitoisuudella 1 mM (Devreker ym., 1998). Toisaalta glutamiini on epävakaata aminohappo ja siitä muodostuu paljon ammoniakkia. Alanyyliglutamiini on dipeptidi ja siksi glutamiinin vakaampi muoto. Siitä muodostuu viljelyn aikana vähemmän ammoniakkia kuin glutamiinista (Lane & Gardner 2003). Alanyyliglutamiinia käytetään joissakin liuksissa, myös yhdessä tämän vertailututkimuksen liuksista, G-1/G-2 (Vitrolife). Glysyli-glutamiini saattaa myös olla glutamiinia parempi vaihtoehto, joka edistää blastokystien kehitystä hiirellä (Summers ym., 2005).

Albumiinia on runsaasti munanjohtimessa ja se on tärkeä viljelyliuosten ainesosa. Se toimii puskurina, osmoottisen paineen säätelijänä ja antioksidanttina. Lisäksi se stabiloi solun kalvoja ja hyvän sitomiskykynsä vuoksi kuljettaa tehokkaasti rasvahappoja, vitamiineja, aminohappoja ja hormoneja (ks. yleiskatsaus Blake ym., 2002).

Viljelyliuksissa käytetään yleisesti puhdistettua ihmisen seerumin albumiinia (HSA, human serum albumin). Yksi seerumin vastineista SSR (synthetic serum replacement) korvaa osittain HSA:ta Universal IVF -liuksessa (MediCult). SSR koostuu insuliinista (0,5 mg / l), tuntemattomasta metalli-ionipuskurista ja kelatoivista aineista (Staessen ym., 1998). Hiivassa on myös tuotettu hyvin puhdistettua, yhdistelmä-DNA -tekniikalla valmistettua ihmisen albumiinia (rHA) tuotenimellä Recombumin (Delta Biotechnology Ltd.). Vitrolife valmistaa liuksia sekä HSA:sta että rHA:sta. Tässä tutkimuksessa käytetyissä Vitrolife:n liuksissa on HSA:ta, G- FERT -liuksessa 10 mg / ml, G-1 ja G-2 -liuksissa 5 mg / ml.

Joillakin aminohapoilla on yhteys myös geenien säätelyyn. Epigeneesi on geenien ilmenemiseen vaikuttavaa säätelyä, joka ei muuta DNA:n sekvenssiä. Joidenkin geenien ilmentyminen riippuu tällaisista DNA:n ja kromosomien rakenteen muutoksista. Osaa DNA:n muutoksista kutsutaan geneettiseksi leimautumiseksi (imprinting), jossa geenin luenta tai sen hiljentyminen riippuu siitä, kummalta vanhemmalta geeni on peräisin. DNA:n emästen metylointi, johon tarvitaan aminohappojen metyyliiryhmiä (-CH<sub>3</sub>), estää geenin luenta. Tämä säätelymuoto säilyy DNA:n ja solun jakautuessa. Alkioissa tapahtuu paljon tärkeitä epigeneettisiä muutoksia, kuten DNA:n metylaation purkamista ja uudelleen



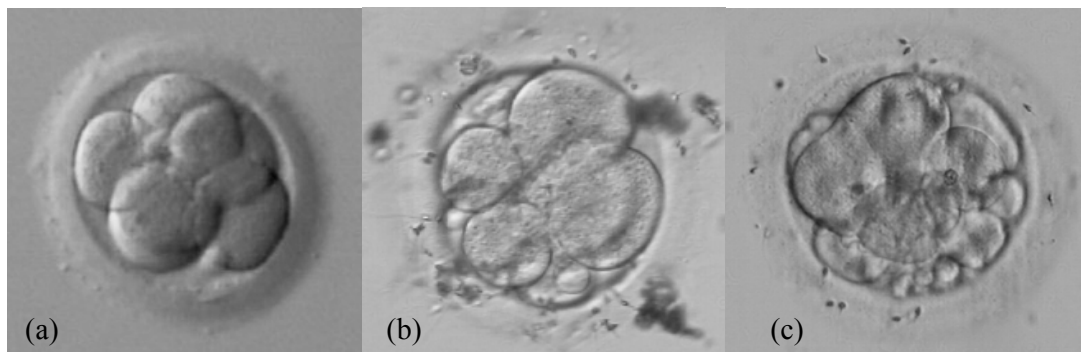
metylointia. Metyyliryhmien lähteenä metioniini voi vaikuttaa viljelyliuoksessa metylaatioon ja sen ylläpitoon. Metioniini kuuluu välttämättömiin aminohappoihin, joten sitä ei ole kaikissa liuoksissa joissa on suosittu ei-välttämättömiä aminohappoja. Viljelyliuoksen aminohapoilla on ainakin hiiren alkioilla tehdyissä kokeissa metylaatiota normalisoiva vaikutus verrattuna viljelyyn ilman aminohappoja (Doherty ym., 2000).

Geenien metylaation muutokset sukusolujen ja alkoiden kehittyessä *in vitro* voivat vaikuttaa olennaisesti alkion jatkokehitykseen. Ongelmana voi olla geenin metylaation liiallinen väheneminen. Viime vuosien tutkimusten mukaan hedelmöityshoidot saattavat lisätä epigeneettisten sairauksien riskiä. Epigeneettisten muutosten lisääntymisen taustalla voisivat olla hedelmöitys- tai viljelytekniikat, lääkitys tai itse hedelmättömyys ja sen syyt (ks. yleiskatsaukset Niemitz & Feinberg, 2004; Jacob & Moley 2005). ISM1 -liuokseen (Meducult) on lisätty metioniinia ja muita rikkiä sisältäviä aminohappoja. Tarkoitus on turvata metylaation ylläpitoa viljelyn aikana ja näin helpottaa alkiossa tapahtuvaa epigeneettistä säätelytoimintaa. Metioniini toimii myös kelaattorina, joten se voi ehkäistä hapettumista.

## 1.5 Alkoiden laatu ja ominaisuudet

Hoidon onnistumiselle on olennaista hyvien alkoiden valinta siirtoon ja pakastettavaksi myöhempää käyttöä varten. Monia alkoiden kehityskyvystä kertovia ominaisuuksia voidaan arvioida mikroskooppisella tarkastelulla. Tärkeimmät laatuparametrit ovat normaali hedelmöittyminen, jakautumisnopeus, blastomeerien tasakokoisuus ja fragmentoituminen. Jos alkion solujen tumat ovat näkyvissä, saadaan monitumaiset alkiot eroteltua joukosta. Usein kiinnitetään huomiota myös esitumien ominaisuuksiin tsygootissa, blastomeerien kirkkauteen tai jyväisyyteen ja *zona pellucida* -kerroksen ominaisuuksiin. Tutkimusten mukaan hyvässä eli kehityskykyisessä alkiossa on parhaimmillaan toisena päivänä hedelmöittämisestä neljä suunnilleen tasakokoista solua ja korkeintaan lievää fragmentaatiota. Kromosomiviat eivät usein ole nähtävissä ilman alkion solujen kromosomitutkimusta; morfologisesti normaalinkin näköisessä alkiossa voi olla kromosomihäiriöitä.

Alkioiden laatu on arvioitava sellaisten ulkoisten ominaisuuksien perusteella, joilla on todettu olevan yhteys alkion elinkykyyn (kuva 4). Heikkolaatuisten alkioiden siirrot johtavat raskauksiin morfologisesti normaaleja alkiota harvemmin.



Kuva 4. (a) Hyvälaatuinen 6 -soluinen alkio, jossa on tasakokoiset blastomeerit. (b) ja (c) Heikkolaatuisia 6 -soluisia alkiota, joissa suuret blastomeerien kokoerot ja fragmentaatiota. Alkioiden pinnassa näkyy useita *zonaan* tarttuneita siittiöitä. (kuvat Väestöliitto 2005)

### 1.5.1 Jakautumisnopeus

Alkion jakautumisnopeus on yksi tärkeimmistä laadusta kertovista tekijöistä. Olennaisia ovat tsygootin aikainen jakautuminen ja alkion solumäärä siirtohetkellä. Tsygootin jakautuminen kahdeksi blastomeeriksi voi tapahtua jo 25-27 tunnin jälkeen siittiöiden lisäämisestä IVF:ssä tai mikrohedelmöityksestä. Aikaisen jakautumisen on monissa tutkimuksissa todettu ennustavan alkion hyvää laatua ja kykyä kiinnittyä kohtuun. Shoukir ym. (1997) tekemässä tutkimuksessa aikaisin jakautuneiden alkioiden laatu IVF:ssä oli parempi ja niistä alkoi enemmän raskauksia myöhemmin jakautuneisiin verrattuna. ICSI -hoidoissa Sakkas ym. (1998) saivat aikaisin jakautuneista alkiosta alkamaan enemmän raskauksia. Koska hedelmöittäminen ICSI:ssä on samanaikainen kaikille munasoluille, voi aikaisen jakautumisen päätellä johtuvan hedelmöittyneen munasolun ominaisuuksista. Raskaustulosten lisäksi alkioiden jakautumisnopeus ja laatu olivat paremmat aikaisin jakautuneiden joukossa (Sakkas ym., 1998). Samanlaisia tuloksia ovat myöhemmin saaneet Lundin ym. (2001) ja Salumets ym. (2003a). Aikaisen jakautumisen yhteydestä parempiin raskaustuloksiin ovat raportoineet Bos-Mikich ym. (2001) ja Wharf ym. (2004). Hedelmöittyneet munasolut voidaan tarkistaa 25 tunnin kuluttua inseminaation tai mikroinjektion jälkeen. Jos osa potilaan alkiosta on jakautunut aikaisin, tästä saadaan hyvä

lisäperuste parhaan alkion valinnalle siinä tapauksessa, että siirtovaiheen alkiot ovat tasalaatuisia.

Ziebe ym. (1997) havaitsivat, että nelisoluisen alkio, vaikkakin hieman fragmentoitunut (>10 %), on kaksi-, kolme-, tai yli neljäsoluista parempi toisena kehityspäivänä. Tasaisesti jakautuneista ja vain vähäisesti fragmentoituneista alkiosta raskauksia alkoi merkittävästi enemmän kuin epäsymmetrisesti jakautuneista alkiosta.

Kahden päivän ikäisten alkioiden siirroissa nelisoluisista on useissa tutkimuksissa alkanut enemmän raskauksia kuin hitaammin tai nopeammin jakautuneista (Vilka ym., 1999). Kolmen päivän ikäisistä alkiosta 8-soluisia pidetään optimaalisina. Magli ym. (2001) havaitsivat, että kolmen päivän ikäisistä alkiosta 7-8 -soluiset ovat useammin kromosomistoltaan normaaleja kuin alle 6- tai yli 9 -soluiset alkiot. 7-9 -soluisten alkioiden on havaittu jatkavan merkittävästi useammin kehitystään blastokystivaiheeseen kuin alle 7- tai yli 9 -soluisten (Alikani ym., 2000).

### **1.5.2 Blastomeerien tasakokoisuus**

Yksi alkioiden laatuksitekereistä on sen solujen tasakokoisuus. Alkion solujen epätasainen jakautuminen voi olla merkki häiriöstä kromosomien tai muun solumateriaalin jaossa tytärsolujen kesken. Selvästi muita pienempi blastomeeri ei välttämättä sisällä tumaa ja on näin ollen vain suuri fragmentti. Blastomeereiltään epätasakokoisista alkiosta (kokoero yli 20 % suurimman ja pienimmän blastomeerin välillä) alkaa vähemmän raskauksia kuin alkiosta, joiden solut ovat tasakokoisia (Hardarson ym., 2001). Tasaisesti jakautuneiden alkioiden joukossa oli edellä mainitussa tutkimuksessa myös enemmän aikaisin jakautuneita alkiota. Useissa tutkimuksissa on osoitettu, että merkittävä fragmentoituminen ja kokoerot alkion solujen kesken ovat merkkejä kromosomihäiriöistä (Magli ym., 2001). Näiden häiriöiden todennäköisyys kasvaa naisen ikääntyessä (Munne ym., 1995).

### 1.5.3 Fragmentaatio

Alkion solujen jakautuessa syntyy yleensä solun ulkopuolisia fragmentteja, kun pieni osa solusta pirstoutuu. Fragmenttien syntymekanismi ja niiden vaikutus alkion jatkokehitykselle on vielä osittain epäselvää. Ilmiö voi johtua solutukirangan epänormaalista toiminnasta tai solukalvon ylituotannosta jakaantumisen aikana. Fragmentaatio voi myös olla merkki solun ohjelmoidusta kuolemasta eli apoptoosista tai kromosomihäiriöistä (ks. yleiskatsaus Ebner ym., 2003). Toisaalta Antczak & Van Blerkom (1999) ehdottivat, että apoptoosi voi paremminkin olla fragmentaation seuraus, ja että tämä riippuu fragmentaation tyypistä, joita on erilaisia. Fragmentit myös toisinaan fragmentoituivat edelleen kyseisessä tutkimuksessa. Fragmentaatiota esiintyy suurimmassa osassa alkioita ja sen määrä on merkittävä arviointiperuste. Fragmenttien määrä ilmaistaan prosentteina koko alkion tilavuudesta. Alikani ym. (2000) havaitsivat merkittävän eron alle ja yli 15 % fragmentoituneiden alkioiden välillä niiden kehityksen jatkumisen suhteen ja yli 35 % fragmentoituminen oli jo merkki erittäin huonosta kehityksestä. Fragmentoituneet alkiot eivät useinkaan saavuttaneet blastokystivaihetta. Myös Van Blerkom ym. (2001) tutkivat fragmentaation syntyä ja merkitystä alkion laatuun. He löysivät viitteitä siitä, että joidenkin blastomeerien väleissä sijaitsevat fragmentit estäisivät paikallisesti liitosten syntyä näiden solujen kesken. Fragmentteja alkoi yleensä syntyä ensimmäisessä solunjakautumisessa, mutta osa niistä hävisi myöhemmin joko palautumalla takaisin soluihin tai hajoamalla. Payne ym. (2005) tekivät samanlaisia havaintoja. Fragmenttien todettiin muodostuvan poikkeuksetta 1. ja 2. jakaantumisessa jakautumiskohtaan ja sen ympärille. Tästä päätellen fragmentoituminen liittyisi solunjakautumisen häiriöihin solukalvossa tai solutukirangassa. Joissakin alkioidissa osa fragmenteista pieneni selvästi kahden tunnin kuluessa jakautumisesta ja niitä palautui takaisin blastomeereihin. Osa fragmenteista oli solussa kiinni olevia ulokkeita, jotka painuivat myöhemmin takaisin soluun. Fragmentaatio näyttää olevan muuttuva prosessi ja sen haitallisuus vaihtelee.

### 1.5.4 Hoidon vaikutus alkion laatuun

Hedelmöitystavan ei ole osoitettu vaikuttavan merkittävästi alkioden laatuun tai hoidon onnistumiseen, kun siittiöt ovat olleet riittävän hyviä IVF- ja ICSI -hoidon vertaamiseen samalle potilaalle (Staessen ym., 1999; Foong ym., 2006). ICSI -alkioilla on saatu aikaan yhtä hyvin raskauksia kuin IVF -alkioilla. Toisaalta mikroinjektio tekniikkana saattaa vaarantaa alkionkehitystä. Siittiöiden laatu on myös yleensä selvästi heikompi ICSI- kuin IVF- hoidoissa. Hedelmöitystekniikoiden vaikutus on joidenkin tutkimusten mukaan ollut havaittavissa vasta toisen viljelypäivän jälkeen ICSI -alkioden heikompana blastokystinmuodostuksena (Dumoulin ym., 2000; Griffiths ym., 2000). Toisaalta näissä tutkimuksissa ICSI -alkioista alkoi hieman enemmän raskauksia. Mahdollinen selitys tälle oli miehestä johtuvan lapsettomuus, jolloin nainen oli hedelmällisempi osapuoli.

Useimmiten potilaalle siirretään kaksi- tai kolmipäiväinen tai blastokystivaiheen alkio. Alkioden viljely kolmanteen päivään helpottaa hyvän siirtoalkion valintaa hyvälaatuisten määrän pienetessä, parantamatta kuitenkaan raskaustuloksia (Laverge ym., 2001). Blastokystivaiheeseen viljeltäessä kehityskelpoisimmat alkio erottuvat parhaiten. Toisaalta viljelyn jatkaminen voi itsessään olla riski, koska alkion kasvu laboratoriossa pitkittyy. Alkion kehittyminen pitemmälle ei myöskään takaa kromosomaalisesti normaalia alkioita.

Nykyään on mahdollista arvioida alkioden kehityskykyä myös aineenvaihdunnan ja jopa hapenkulutuksen perusteella. Houghton ym. (2002) tutkivat eri aminohappojen kulutusta ja ilmaantumista liuokseen viljelyn aikana ja havaitsivat niissä yhteyden alkion kehityskyvyn kanssa. Jo kahden päivän ikäisestä alkioista voi olla mahdollista ennustaa kehityspotentiaalia esimerkiksi sen aminohappometabolian perusteella. Aineenvaihduntaan perustuvat menetelmät eivät kuitenkaan ole vielä rutiinikäytössä.

## 1.6 Oksidatiivinen stressi

Munanjohtimissa on vain kolmasosa ilmakehän happipitoisuudesta. Maljalla kasvavat solut altistuvat yleensä suurille happipitoisuuksille verrattuna tilanteeseen *in vivo*. Reaktiivisia happiyhdisteitä syntyy alkion normaalissa energia-aineenvaihdunnassa, mutta ulkopuoliset tekijät voivat lisätä niiden määrää. Koska suuri happipitoisuus ja radikaalit lisäävät hapettumista, ovat liuosten pelkistyspotentiaali ja antioksidantit tärkeitä IVF:ssä, jossa niiden tarve on suuri. Toisinaan reaktiivisia happiyhdisteitä syntyy enemmän kuin antioksidanttiset suojausmekanismit pystyvät korjaamaan ja solu kärsii oksidatiivisesta stressistä ja sen aiheuttamista soluvaurioista. Oksidatiivinen stressi on yhteydessä alkoiden heikkoon morfologiaan, fragmentaatioon ja apoptoosiin, mutta vaikutukset eivät välttämättä ole näkyvissä alkioissa vielä viljelyn aikana (ks. yleiskatsaus Burton ym., 2002).

### 1.6.1 Reaktiiviset happiyhdisteet

Yleisesti esiintyviä reaktiivisia happiyhdisteitä ovat vetyperoksidi ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hydroksyyliiradikaali ( $\cdot\text{OH}$ ) ja superoksidiradikaali ( $\text{O}_2\cdot^-$ ). Monet entsyymit, kuten katalaasi, superoksididismutaasi ja glutationiperoksidaasi, muuttavat hapen haitallisimpia muotoja vähemmän haitallisiksi tai vaarattomiksi. Happiradikaalit pääsevät kulkeutumaan solun kalvojen läpi. Ne vaurioittavat proteiineja, DNA:ta ja lipidejä ja voivat aiheuttaa alkoiden kehityksen hidastumisen tai pysähtymisen (ks. yleiskatsaus Guérin ym., 2001). Metallikationit kuten  $\text{Fe}^{2+}$  ja  $\text{Cu}^{2+}$  voivat happeen yhtyessään aiheuttaa ketjureaktion, jonka tuloksena syntyy haitallisia radikaaleja. Vetyperoksidin ja rautaionin reaktio taas aiheuttaa hydroksyyliiradikaalin muodostumisen. Kelaattorit, kuten EDTA, vähentävät näitä reaktioita sitomalla metallikationeja.

Happiradikaalien lähteet vaihtelevat hieman hedelmöitystavan mukaan. IVF:ssä siittiöt, munasolut ja jopa munasoluihin kiinni jääneet kumulussolut voivat tuottaa radikaaleja liuokseen. ICSI:ssä lähteenä ovat vain itse munasolut, koska kumulussolut poistetaan

ennen mikroinjeksiota. Bedaiwy ym. (2004) löysivät kuitenkin saman määrän happiradikaaleja IVF- ja ICSI- alkioiden viljelyliuoksista alkioiden ensimmäisenä kehityspäivänä. Happiradikaalien suuri pitoisuus ensimmäisenä hedelmöittämisen jälkeisenä päivänä oli yhteydessä huonompiin raskaustuloksiin ja ICSI -alkioilla heikompaan hedelmöittymiseen, hitaampaan jakautumiseen ja lisääntyneeseen fragmentaatioon. IVF:ssä happiradikaalien suuri määrä ei ennustanut heikkoa alkionkehitystä, minkä syynä arveltiin olevan mm. kumulussolujen antioksidanttinen toiminta (Bedaiwy ym., 2004).

### 1.6.2 Tiolit

Happiradikaalit reagoivat monien aminohappojen kanssa. Erityisen herkästi ne reagoivat rikkiä, kuten tioliryhmiä, sisältävien aminohappojen ja proteiinien kanssa. Osa näistä reaktioista on haitallisia. Tioliryhmien hapettuessa voi aminohappojen ja proteiinien välille muodostua ylimääräisiä rikkisiltoja (-S-S-), jotka muuttavat proteiinien rakennetta. Tiolien sulfydryyliryhmät (-SH) toimivat pelkistysvoimana haitallista hapettumista vastaan. Jotkut tiolit toimivat antioksidanteina säilyttäen esimerkiksi proteiinien kysteiiniaminohappoja pelkistyneessä muodossa. Solut pyrkivät pitämään yllä tiolien puskurointiominaisuuksia, koska tiolit suojelevat tärkeitä molekyyliä hapettumiselta. Antioksidanttien ja tiolien määrä on olennainen varsinkin jos solu kärsii hapettavista olosuhteista. Solujen tai liuoksen hapettuneisuutta voidaan arvioida vertaamalla hapettuneiden ja pelkistyneiden tioliryhmien määriä.

Glutathioni (GSH) on tioliyhdiste ja ehkä tärkein antioksidanttinen suojausmekanismi alkioissa. Se on tripeptidi, joka muodostuu kolmesta aminohaposta: glysiinistä, glutamaatista ja kysteiinistä. Glutathionin määrä solussa on siis riippuvainen myös näiden aminohappojen määristä. Kysteiini taas kuuluu välttämättömiin aminohappoihin. Se on tioli ja tärkeä antioksidantti jonka määrä vaikuttaa solun kykyyn vastustaa hapettumista. Solunsisäisen GSH:n pitoisuus voi olla tuhatkertainen solun ulkopuoliseen verrattuna. Glutathionia esiintyy pelkistyneessä (GSH), hapettuneessa (GS-SG) ja proteiineihin sitoutuneessa disulfidi- (GS-S-proteiini) muodossa. Glutathioniperoksidaasi on entsyymi, joka käyttää GSH:ta mm. vetyperoksidin ja lipidiperoksidien pelkistämiseen vaarattomiksi,

jolloin glutationi hapettuu. Glutationireduktaasi katalysoi hapettuneen glutationin pelkistymistä uudelleen GSH:ksi. Glutationin, erityisesti sen pelkistyneen muodon, ja muiden tioliyhdisteiden määrät vaikuttavat solun kykyyn suojautua oksidatiiviselta stressiltä. Pelkistyneen ja hapettuneen glutationin suhde kertoo solun hapetus-pelkistystilasta.

### 1.6.3 Nukleotidit

Hypoksantiini on puriinien hajotessa syntyvä tuote, joka voi myös muuttua ksantiiniksi puriinien hajotuksen lopputuotteena. Ksantiinioksideasi hapettaa hypoksantiinia ksantiiniksi ja samalla syntyy haitallisia superoksidianioneja. Alkiot ottavat hypoksantiinia liuoksesta ja sitä käytetään uudelleen puriinimetaboliassa. Hypoksantiinin kertyminen viittaa liialliseen puriinikataboliaan. Hypoksantiini (30  $\mu\text{M}$ ) ja glukoosi ovat viljelyliuoksessa hiiren alkioille haitallisia ja niiden poistaminen liuoksesta edistää alkionkehitystä (Dienhart ym., 1997). Glukoosi estää puriinien uudelleenkäyttöä, mikä taas lisää happiradikaalien syntymistä (ks. yleiskatsaus Guérin ym., 2001). Glukoosista ja puriinien hajoamisesta voi siis olla haittaa alkioille. Nukleiinihappojen hajotessa puriinien kataboliareitti kuormittuu ja hajoamistuotetta eli hypoksantiinia kerääntyy, mikä on alkioille haitallista. Alkion oman genomien aktivoitumista edeltää lisääntynyt puriininukleotidien hajoaminen, kun vanhaa maternaalista lähetti-RNA:ta hajotetaan. Puriinien katabolian lisääntyminen lisää reaktiivisten happiyhdisteiden syntymistä.

Alkioissa tuotetaan ATP:tä glykolyysillä ja soluhengityksessä oksidatiivisella fosforylaatiolla. Trimarchi ym. (2000) tekemien mittausten mukaan 2-4 -soluinen alkio käyttää alle 30 % kuluttamastaan hapesta oksidatiivisessa fosforylaatiossa, mutta blastokystivaiheessa yli kaksinkertaisen määrän. Pyruvaatin poistaminen liuoksesta johti kaksisoluisien alkoiden hapenkulutuksen vähenemiseen 26 % verrattuna pyruvaattia sisältävään liuokseen. Hapenkulutuksen väheneminen voisi johtua siitä, että alkiossa glukoosin käyttö oksidatiivisessa fosforylaatiossa on rajallista. Alkio muuttaa glukoosia enimmäkseen laktaatiksi, mutta hapettaa liuokseen lisättyä pyruvaattia ja laktaattia. Oksidatiivisen fosforylaation osittainen estäminen vähentää ATP -tuotantoa ja radikaalien muodostumista ja edistää naudan alkoiden kehitystä (Thompson ym., 2000). Alkion



energiametabolian säätelyllä voitaisiin saada vähennettyä oksidatiivista stressiä. Liuosten glukoosi-, pyruvaatti- ja laktaattipitoisuuksia onkin tuotekehittelyn aikana muutettu.

#### 1.6.4 Viljelyliuosten antioksidantit

Reaktiivisten happiyhdisteiden haittoja on pyritty vähentämään lisäämällä liuoksiin vitamiineja, kelaattoreita ja antioksidantteja. Eniten käytettyjä ei-entsymaattisia antioksidantteja ovat EDTA, askorbiinihappo (C-vitamiini), hypotauriini ja tauriini. EDTA estää GSH:n hapettumista. C-vitamiini estää hapettumista edistämällä pelkistäviä olosuhteita liuoksessa ja vähentämällä monien vapaiden radikaalien määrää sellaisenaan ja entsyymien katalysoimien reaktioiden avulla.

E-vitamiinia eli tokoferolia on luonnostaan solun kalvoissa ja se suojaa kalvolipidejä hapettumiselta. Viljelyliuoksessa E-vitamiini edistää naudan (Olson & Seidel, 2000) ja hiiren (Wang ym., 2002) alkoiden kehitystä mutta ei yhtä tehokkaasti kuin C-vitamiini. Tauriini on antioksidanttina toimiva aminohappo, joka on havaittu hyödylliseksi ihmisalkoiden kehitykselle (Devreker ym., 1999). Tauriinia on joissakin viljelyliuoksissa, kuten tässä vertailussa käytetyissä liuoksissa ISM1 (MediCult) ja G-FERT, G-1 (Vitrolife).

Metioniini voi muuttua kysteiiniksi muutaman reaktion kautta, joten näiden aminohappojen pitoisuudet liittyvät toisiinsa. Kystiini taas on kysteiniin hapettunut muoto, jossa kaksi kysteiniä muodostaa rikkisidoksen. Liuokseen lisätty kysteini nostaa sian munasolujen glutationipitoisuutta, edistäen siten myös siittiön esituman muodostumista (Yoshida ym., 1993). Glutationi on pelkistyspotentiaalinsa vuoksi tärkeää siittiön esituman syntymiselle hedelmöitymisen yhteydessä. Tässä tapahtumassa siittiön pakatun DNA:n purkaminen vaatii mm. disulfidisiltojen pelkistämistä eli avaamista.

Glutationi kierrättää askorbiinihappoa pelkistämällä sitä. Glutationin riittävä muodostuminen kypsyvään munasoluun on välttämätöntä hedelmöitymiselle ja alkionkehitykselle. GSH:n pitoisuus hiiren munasoluissa ja alkioissa *in vivo* laskee hedelmöitymisen jälkeen ja alkion kehittyessä blastokystivaiheeseen kymmenesosaan munasolun pitoisuudesta (7,0 mM → 0,7 mM) (Gardiner & Reed, 1994). Glutationin

määrä alkioissa on pienempi *in vitro* kuin *in vivo*. Alkioiden kyky muodostaa sitä on hyvin rajoittunut blastokystivaiheeseen saakka.

Kysteini ja GSH ovat epävakaita ja hapettuvat nopeasti liuoksessa, mikä rajoittaa niiden hyödyllisyyttä. Liuokseen lisätyn GSH:n vaikutuksista on ristiriitaista tietoa, mutta toisinaan se on todettu hyödylliseksi. Boquest ym. (1999) onnistui edistämään sian alkioiden kehittymistä blastokystivaiheeseen (36 % ja 34 % vs. 19 %) lisäämällä hedelmöitysvaiheessa 0,125- 0,25 mM GSH:ta, tosin tätä suurempi pitoisuus (0,5 mM) ei ollut enää hyödyllistä. Kim ym. (1999) tekemässä tutkimuksessa glutationin lisääminen liuokseen 1-10 mM pitoisuudessa lisäsi GSH:n pitoisuutta naudan munasoluissa. GSH:n määrä liuoksessa alkoi laskea jo kolmessa tunnissa. Suuri määrä glutationia (10 mM) oli haitallista. Soluilla voi tällaisessa tilanteessa olla liian pelkistävät olosuhteet. Glutationilisän hyödyllisyys viljelyliuoksissa on vielä epäselvä.

## 2. Tutkimuksen tarkoitus

Tässä tutkimuksessa verrattiin alkioviljelyssä käytettäviä, koostumuksiltaan erilaisia kaupallisia viljelyliuoksia. Tavoitteena oli selvittää, onko liuoksilla alkioiden elinkykyyn tai hoidon lopputulokseen vaikuttavia eroja ja sopiiko jokin liuoksista toista paremmin alkioiden viljelyyn kolmanteen päivään saakka. Yksi osa tutkimuksesta koostui kahden eri viljelytavan (avomalja- ja pisaraviljely) vertailusta. Liuosten vaikutuksia oli tarkoitus selvittää alkioiden laadusta kertovien ominaisuuksien ja raskaustulosten perusteella.

Toinen tavoite oli selvittää tiettyjä viljelyliuosten kemiallisia ominaisuuksia. Vertailtavista liuoksista määritettiin sellaisten tiolien (glutationi ja kysteini) ja nukleotidien (hypoksantiini ja adenosiniinifosfaatti) pitoisuuksia, jotka voisivat kertoa liuosten ominaisuuksista oksidatiivisen stressin vastustamisessa. Liuosten koostumusta ja muuttumista soluviljelykaapissa lämpiämisen ja alkioviljelyn aikana haluttiin selvittää. Tämän suuntaa antavan lisätutkimuksen tavoite oli paljastaa eroja liuosten koostumuksessa erityisesti hapettumiseen liittyen. Tavoitteena oli myös selvittää, voisiko liuoksesta mitattu tioli- ja nukleotidikoostumus olla yhteydessä alkioiden laatuun tai kehityspäivään.

### **3. Materiaali ja menetelmät**

Tutkimuksen kliininen osuus tehtiin Väestöliiton lapsettomuuslinikalla Helsingissä huhtijoulukuussa 2005. Vertailussa oli kolme erilaista alkioviljelyyn kehitettyä liuosta kahdelta eri yhtiöltä (MediCult, Jyllinge, Denmark ja Vitrolife, Kungsbacka, Sweden). Tutkimuksessa oli mukana 227 IVF- ja ICSI -hoitoa, joista 199:ssä oli tarkoitus siirtää kahden päivän ikäinen alkio. Alkioita oli tutkimuksessa yhteensä 1358.

#### **3.1 Vertailuryhmät ja liukset**

Liuksen ja viljelytavan vaikutusta alkioden laatuun ja raskaustuloksiin tutkittiin neljässä erilaisessa viljelyryhmässä. Alkionsiirrot näissä neljässä ryhmässä tehtiin toisena päivänä (D2). Universal IVF -liuosta verrattiin avomalja- ja pisaraviljelyssä, ISM1 ja G-1 PLUS -liuksia käytettiin vain pisaraviljelynä (taulukko II). Lisäksi kolmannen päivän (D3) alkionsiirroissa oli kaksi liuosryhmää, Universal IVF (avo) ja Vitrolife G-1 PLUS (taulukko III). Nämä viljelyliukset on tarkoitettu alkioden viljelyyn kolmanteen päivään saakka ja ne eroavat koostumuksiltaan muun muassa hiilihydraattien, aminohappojen ja antibioottien suhteen (taulukko IV). Kahdessa ryhmässä käytettiin lisäksi muita liuksia hedelmöittämisvaiheeseen (G-FERT PLUS, Vitrolife) ja alkionsiirtoon (UTM, MediCult) ja (G-2 PLUS, Vitrolife). Universal IVF -liuksen glukoosipitoisuus on muita suurempi, mikä voi hyödyttää siittiötä hedelmöittämisvaiheessa. ISM1 ja Vitrolife G-1 ovat monimuotoisempia liuksia, joiden ajatellaan vastaavan paremmin alkioden aineenvaihdunnan tarpeisiin ja joissa on enemmän haitallisilta aineilta suojaavia tekijöitä. Toisaalta liusten ainesosien hyödyistä tarvitaan lisätietoa. Yksinkertaisen liuksen käytöstä voi olla se hyöty, että parhaat alkiot erottuvat paremmin joukosta heikompien karsiutuessa pois. Alkion kohtuun kiinnittymistä edistävä liuos voisi myös tarpeettomasti auttaa myös epänormaalia alkioita kiinnittymään.

Taulukko II. Kahden päivän (D2) viljelyssä käytetyt liuokset, viljelymenetelmä, hedelmöitystapa ja alkioiden määrä. Neljällä potilaalla osa munasoluista hedelmöitettiin IVF:llä ja osa ICSI:llä (jako).

Liuos:	Viljely:	Potilaita:	IVF / ICSI / jako	Alkioita
MediCult Universal IVF	avomalja	49	32 / 17	292
MediCult Universal IVF	pisara	43	32 / 10 / 1	279
MediCult ISM1 & UTM	pisara	53	36 / 15 / 2	256
Vitrolife G-FERT / G-1 / G-2 PLUS	pisara	54	39 / 14 / 1	352

Taulukko III. Kolmen päivän (D3) viljelyssä käytetyt liuokset, viljelymenetelmä, hedelmöitystapa ja alkioiden määrä.

Liuos:	Viljely:	Potilaita:	IVF / ICSI	Alkioita
MediCult Universal IVF	avomalja	15	9 / 6	104
Vitrolife G-FERT / G-1 / G-2 PLUS	pisara	13	10 / 3	75

Taulukko IV. Valmistajien ilmoittama sisältö liuoksista Universal IVF ja ISM1 (MediCult) ja G-1(Vitrolife). Earle's balanced salt solution on glukoosia sisältävä suolaliuos.

Universal IVF	ISM1	Vitrolife G-1 PLUS	
Earle's balanced salt solution	HSA	Alanine	Magnesium sulphate
SSR	Glucose, Lactate, Pyruvate	Alanyl-glutamine	Penicillin G
HSA (10 mg / ml) *	Physiological salts	Asparagine	Potassium chloride
Glucose (5,17 mM) *	Essential amino acids	Aspartate	Proline
Na -pyruvate (0,88 mM) *	Non -essential amino acids	Calcium chloride	Serine
Na -bicarbonate	Vitamins	EDTA	Na -bicarbonate
Streptomycin (50 mg / l)	Nucleotides	Glucose	NaCl
Penicillin (50 000 IU / l)	Na -bicarbonate	Glutamate	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Phenol red (9,3 mg / l) *	Streptomycin (40 mg / l)	Glycine	Na -lactate
	Penicillin (40 000 IU / l)	HSA (5 mg / ml)	Na -pyruvate
	Phenol Red	Hyaluronan	Taurine

\* Staessen ym.(1998)

Tutkimus tehtiin kolmessa vaiheessa, joissa oli aina kaksi ryhmää vertailussa rinnakkain. Potilaat jaettiin sattumanvaraisesti kuhunkin ryhmään viimeistään munasarjapunktiota edeltävänä päivänä. Normaalisti hedelmöittyneet munasolut viljeltiin pisaroissa lukuunottamatta Universal IVF (avo) -ryhmää. Kunkin potilaan kaikki munasolut viljeltiin keskenään samalla tavalla. Kaikissa vaiheissa käytettiin Falcon -viljelymaljoja (Becton Dickinson, San Jose, USA). Keskikuoppamaljoilla liuostilavuus oli noin 800 µl. Pesaraviljelyssä maljalle pipetoitiin 3-6 pisaraa, kukin 30-40 µl, ja peitettiin noin 5 ml:lla

alkiotestattua paraffiiniöljyä (Liquid Paraffin, MediCult, Vitrolife -ryhmissä Ovoil-100, Vitrolife).

Tutkimuksen aikana muu solulaboratorion toiminta ei poikennut normaalista. Potilaiden oma hormonitoiminta vaimennettiin GnRH:n agonistilla tai antagonistilla (supressio), minkä jälkeen munasarjojen stimulaatioissa käytettiin rFSH:ta. Munasarjapunktio tehtiin 36 tunnin kuluttua irroituspistoksen (hCG) antamisesta. Miehen antama siemennestenäyte pestiin spermalaboratoriossa, jossa siitä eroteltiin mahdollisimman hyvin liikkuvia siittiöitä. Siittiöitä laimennettiin sopivaan pitoisuuteen (noin 3,5 miljoonaa/ml) hedelmöittämistä varten. (Väestöliiton potilasohje 2004). Vitrolife-ryhmässä siittiöt laimennettiin G-FERT-liuokseen, muissa ryhmissä Universal IVF -liuokseen.

Munasarjapunktion yhteydessä kullekin keskikuoppamaljalle kerättiin IVF:ssä 4-5, ICSI:ssä 6 munasolua. Pestyjä siittiöitä lisättiin IVF:ssä 4-6 tuntia munasolukeräyksen jälkeen noin 175 000 maljaa kohti. Ennen mikroinjektiota munasoluja ympäröivä kumulussolukko irroitettiin pipetoimalla niitä kevyesti viljelyliuoksessa, johon oli lisätty noin 112 µg / ml (80 IU / ml) hyaluronidaasientsyymiä (type IV-S, Sigma H4272). Kypsät munasolut hedelmöitettiin mikroinjektiolla 5-6 tuntia punktiosta öljyllä peitetyissä liuospisaroissa. Pisarat (noin 10 µl) tehtiin viljelymaljalle kunkin ryhmän viljelyliuoksesta, jossa oli 0,015 M HEPES -puskuri (Gibco, 15630-049). Siittiöille tehtiin omat liuospisarat, joissa käytettiin siittiöiden liikkeen hidastamiseksi noin 2 osaa PVP:tä (MediCult) ja 1 osa viljelyliuosta. Mikroinjektiossa käytettiin Narishige -mikroinjektiolaitteistoa (Tokyo, Japan) ja valmiita lasisia mikropipettejä (Swemed, Kungsbacka, Sweden). Injektoidut munasolut siirrettiin puhtaille liuosmaljoille.

Seuraavana päivänä eli noin 16-20 tuntia hedelmöittämisestä tarkistettiin munasolujen hedelmöittyminen. Normaalisti hedelmöittyneet solut (kaksi esitumaa) siirrettiin jatkoviljelyyn puhtaille maljoille (noin 6 solua keskikuoppamaljaa kohti tai 1-3 solua pisaraa kohti). IVF:ssä esitumien havaitsemiseksi munasolut puhdistettiin niitä ympäröivästä kumulussolukosta. Siirtopäivän mukaan toisena tai kolmantena päivänä hedelmöittämisestä alkiot arvioitiin sovittujen laatuparametrien mukaan. Alkioiden laadusta kertovat tiedot kirjattiin kaavakkeisiin, joista ilmeni kerättyjen ja

hedelmöittyneiden munasolujen määrä, jakautuneiden, potilaalle siirrettyjen ja pakastettujen alkioiden määrä sekä laadusta kertovat ominaisuudet. Näitä olivat alkioiden aikainen jakautuminen, solumäärä siirtopäivänä, fragmentaation määrä, alkion blastomeerien kokoerot (tasakokoisuus) ja monitumaisuus. Alkioiden yleinen laatu määriteltiin kolmen luokan avulla (taulukko V). Luokitus tehtiin jälkepäin ottaen huomioon alkioiden jakautumisnopeus, fragmentaatio, blastomeerien tasakokoisuus ja niissä havaittu monitumaisuus.

Taulukko V. Alkioiden yleisen laadun arviointi kehityspäivän mukaan (D2 / D3).

Alkioluokka	Solumäärä		Fragmentaatio	Blastomeerien kokoero	monitumaisuus
	D2	D3			
1 Hyvä	4 - 5	7-10	0 - 15 %	0 - 15 %	-
2 Keskierto	2 - 3, 6	5-6	16 - 30 %	16 - 30 %	-
3 Huono	6 <sup>a</sup>	2-4, >10	> 30 %	> 30 %	+

<sup>a</sup> Kun blastomeerien kokoero >15 % ja fragmenttisuus >5 %

Raskaustulokset laskettiin positiivisten hCG -arvojen (human chorionic gonadotrophin), kliinisten ja jatkuvien raskauksien perusteella. Raskaus määriteltiin kliiniseksi, kun kohdussa oli ultraäänitutkimuksessa havaittu sikiöpussi. Kliiniset raskaudet laskettiin jokaista alkionsiirtoa kohti. Implantaatioprosentilla tarkoitetaan kohtuun kiinnittyneiden alkioiden osuutta siirretyistä alkioista. Jatkuvalle raskaudelle tarkoitetaan ultraäänitutkimuksella varmistettua, normaalisti jatkunutta raskautta. Liuosvertailun tulosten kuten alkioiden laadun ja raskauksien vertailussa käytettiin kii<sup>2</sup> -testiä. Erot katsottiin tilastollisesti merkitseviksi kun  $P < 0,05$ .

### 3.2 Tioli- ja nukleotidimittaukset

Viljelyliuosten tioli- ja nukleotidimääritykset tehtiin yhteistyössä Helsingin yliopiston kanssa (Biomedicum Helsinki, Haartmaninkatu 8, 00290 Helsinki). Näytteiden analysoinnin suunnitteli Risto Lapatto, joka myös auttoi mittaustulosten käsittelyssä ja tulkinnassa. Liuosnäytteiden käsittelyn ja mittaukset teki Sari Lindén. Tioleista mitattiin kysteiinin ja glutationin, nukleotideista hypoksantiinin, ATP:n ja NAD:n pitoisuuksia.

Uusista pulloista kutakin vertailtavaa liuosta (Universal IVF, ISM1 ja Vitrolife G-1 PLUS) otettiin 100 µl näytteet. Kaikista liuoksista tehtiin sekä keskikuoppamaljoille että öljyillä peitetyiksi pisaroiksi maljoille näytteet, joita viljeltiin ilman alkioita 1 ja 2 vuorokautta soluviljelykaapissa +37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Näytteet vastasivat kahden ja kolmen päivän alkioviljelyn olosuhteita. Käytetyiltä alkoiden viljelymaljoilta otettiin liuosnäytteet kahden ja kolmen päivän viljelyn jälkeen sekä avo- että pisaraviljelyistä. Näytteitä kerättiin erikseen sekä IVF- että ICSI -alkioiden maljoilta sekä joiltakin maljoilta, joissa oli kehittynyt pelkästään hyvä- tai heikkolaatuisia alkioita. Keskikuoppamaljoilta otettiin talteen kustakin 100 µl viljelyliuosta, pisaraviljelyistä 20-30 µl jokaisesta samanlaista näytettä edustavasta pisarasta. Kutakin näytettä otettiin 3 samanlaista, alkoliuoksista 2-3 toisiaan vastaavaa. Näytteet säilytettiin pakastimessa -20 °C.

Liuosnäytteistä tutkittiin tiolien hapettuneisuutta mittaamalla vapaiden (pelkistyneiden) ja hapettuneiden tiolien määriä. Ei-vapaa tioli voi olla sitoutuneina joko toiseen tioliin tai suurempaan molekyyliin kuten proteiiniin. Osa näytteistä käsiteltiin ditiotreitolilla (DTT) vapaiden ja ei-vapaiden tiolien määrien vertaamiseksi. DTT pelkistää tiolit sulfydryyleiksi (-SH) ja avaa disulfidisillat mutta ei muita kovalentteja sidoksia. DTT:n tarkoitus on selvittää hapettuneiden (ei-vapaiden) tiolien määrä. Ilman DTT:tä näytteessä on vain vapaita tioleja, DTT:llä pelkistyvät (irtoavat) pieniin molekyyliin sitoutuneet tiolit, jolloin voidaan laskea vapaan tiolin suhde ei-vapaaseen (-DTT / (+DTT - [-DTT])).

Ilman alkioita viljellyt tiolinäytteet käsiteltiin DTT:n lisäksi hapolla (trikloorietikkahappo), jotta voitaisiin määrittää proteiineihin sitoutuneiden tiolien osuus. Hapon tarkoitus on



tiolien säilyttäminen niin, etteivät ne enää määryksiä tehtäessä reagoisi muiden molekyylien kanssa. Näin vapaat tiolit säilyvät vapaina ja proteiineihin sitoutuneet kiinni proteiineissa. Arvio proteiineihin sitoutuneen tiolin osuudesta saadaan DTT -käsitellyistä näytteistä sen mukaan, onko näyte happokäsitelty vai ei. Näiden tulosten erotus kertoo proteiineihin sitoutuneista tioleista, jotka ovat happokäsittelystä näytteessä säilyneet sitoutuneina. Toisin sanoen happokäsitellyssä näytteessä on oletettavasti DTT:llä irronnut vain pieniin molekyyliin sitoutunut osa tioleista, kun taas pelkällä DTT:llä käsittelyn ajatellaan pelkistävän (vapauttavan) kaikki tiolit.

Tiolien happokäsittelyssä 40 µl:aan liuosnäytettä lisätiin 5 µl 100 % trikloorietikkahappoa, sekoitettiin ja seisetettiin 5 minuuttia. Näyte sentrifugoitiin ja neutraloitiin 2,5 µl:lla 10 N natriumhydroksidia ja sentrifugoitiin. Näyte jaettiin puoliksi, joista toinen osa käsiteltiin DTT:llä ja toinen ilman. Sekä hapolla että ilman käsiteltyjen näytteiden DTT -käsittely tehtiin seuraavasti: 20 µl liuosnäytettä sekoitettiin 5 µl 50 mM DTT / H<sub>2</sub>O ja inkuboitiin 30 min. +37 °C (+DTT). Näytteisiin lisättiin 25 µl monobromobimaania (1:5) ja inkuboitiin 5 min. pimeässä, minkä jälkeen lisättiin 5 µl 100 %:sta trikloorietikkahappoa ja sentrifugoitiin. Näytteet ilman DTT:tä käsiteltiin heti monobromobimaanin kanssa ilman 30 min. inkubaatiota DTT:n kanssa.

Glutationin, kysteiinin ja nukleotidien pitoisuudet määritettiin HPLC - nestekromatografialla (high-performance liquid chromatography). HPLC-laitteisto oli Shimadzu LC-10Avp kaikissa määryksissä. Standardisuora tehtiin kaupallisilla glutationilla ja kysteiinillä ja näin saadut näytteiden pitoisuudet suhteutettiin proteiinimäärään. Näytteiden pitoisuudet mitattiin sekä hapolla ja ilman että DTT:llä ja ilman. Tiolien analyseissä 1 µl supernatanttia injektoitiin Waters Novapak C-18 HPLC - kolumniin (4 µm, 3,9 x 150 mm) käyttämällä isokraattista liuossysteemiä (liikkuvan faasin koostumus pysyy vakiona). Liikkuva faasi koostui 7 % asetonitriilistä, 0,25 % etikkahaposta ja 0,25 % perkloorihaposta pH 3,8. Fluoresoiva tuote tunnistettiin käyttämällä Shimadzu RF-10Axl spektrofluorometriä (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Eksitaatioaallonpituus oli 394 nm ja emissioaallonpituus 480 nm. Proteiinimääritys tehtiin Bio-Rad DC protein assay kit:llä.

Nukleotidinäytteisiin (15 µl) lisättiin 45 µl 0,42 N perkloorihappoa, sentrifugoitiin, ja supernatantti neutraloitiin 4,42 N kaliumhydroksidilla. Uuden sentrifugoinnin jälkeen näyte ajettiin HPLC:llä. 25 µl supernatanttia injektoidiin käänteiseen pylväaseen (Ultra Techsphere 5 ODS, Labtronic Oy, Vantaa) ja UV -detektorissa aallonpituudeksi asetettiin 254 nm. Puskuri A:ta (0,1 M kaliumbisfosfaatti [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], 8,0 mM tetrabutyyliammoniumetyylisulfaatti, pH 6,0) ajettiin 5 minuuttia 1,0 ml / min., jonka jälkeen puskuria B (puskuri A jossa 30 % metanoli) lisättiin lineaarisesti 20 minuutin aikana 100 % pitoisuuteen. 100 % puskuri B:llä jatkettiin 5 minuuttia. Puskuria A lisättiin lineaarisesti 2 minuutin ajan pitoisuuteen 100 %, jota ajettiin vielä 8 minuuttia. Ainesosien pitoisuudet määritettiin vertaamalla niiden kolmunin läpi kulkemiseen kuluneita aikoja (retentioaikoja) ja piikkialueita tunnettuihin, spektrofotometrisesti kalibroituihin standardeihin.

## 4. Tulokset

Potilaiden keskimääräinen ikä oli kaikki ryhmät mukaan luettuna 35,7 vuotta, toisen päivän (D2) alkionsiirroissa 35,1 vuotta. Ryhmien välillä ei ollut merkitseviä eroja potilaiden iän, stimulaatiotyypin, hedelmöitystavan, kerättyjen munasolujen tai siirrettyjen alkoiden määrien suhteen. Kolmen päivän (D3) viljelyssä verrattuihin kahteen ryhmään saatiin yhteensä vain 28 potilasta, joten näiden ryhmien kohdalla ainoastaan alkiotietoja käytettiin aineiston käsittelyssä eikä raskaustuloksia huomioitu.

### 4.1 Raskaustulokset

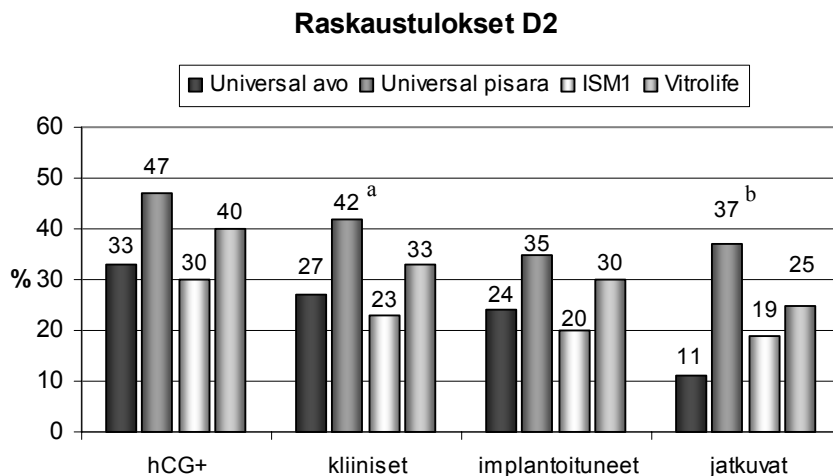
Alkoiden laadulla on yhteys siirrettyjen alkoiden määrään, sillä laadultaan hyviä alkioita siirretään useimmiten vain yksi. Toisen päivän siirroista oli yhden alkion siirtoja keskimäärin 86 %, loput olivat kahden alkion siirtoja. Nämä luvut vaihtelivat jonkin verran ryhmien kesken (taulukko VI). Vitrolife -ryhmässä oli eniten sekä hyvälaatuisten alkoiden siirtoja että yhden alkion siirtoja. Universal IVF -liuoksen pisaraviljelyryhmässä taas oli vähiten siirrettyjä hyvälaatuisia alkioita ja yhden alkion siirtoja. Positiiviseen raskaustestiin (hCG+) johtaneista yhden alkion siirroista huomattavan suuressa osassa (91,5 %) oli siirretty nelisoluinen alkio. Loput olivat kaksi- ja viisisoluisten alkoiden siirtoja.

Taulukko VI. Yhden alkion siirtojen osuudet alkionsiirroista ja hyvälaatuisten alkoiden siirrot.

Alkionsiirrot D2	Universal IVF avo	Universal IVF pisara	ISM1	Vitrolife
Yhden alkion siirrot / kaikki siirrot (%)	39 / 45 (87)	32 / 40 (80)	40 / 47 (85)	48 / 52 (92)
Siirretty vain hyviä alkioita %	58	57	68	79

Positiivisia raskaustuloksia oli toisen päivän siirroista keskimäärin 37,5 %. Yhtään kaksosraskautta ei ryhmissä alkanut. Kliinisiä raskauksia oli keskimäärin 31 %

alkionsiirtoa kohti, eniten Universal (pisara) -ryhmässä (kuva 5). Vähiten positiivisia raskaustestejä, kliinisiä raskauksia ja implantoituneita alkioita siirrettyjä kohti oli ISM1 -liuosryhmässä. Ainoa tilastollisesti merkitsevä ero kuitenkin muodostui jatkuvista raskauksista, joita oli Universal (pisara) ryhmässä 37,5 % alkionsiirtoa kohti, kun taas saman liuoksen avoviljelyssä, Universal IVF (avo) vastaava luku oli 11,1 % ( $P < 0,01$ ).



Kuva 5. Positiivisten raskaustestien (hCG+), kliinisten ja jatkuvien raskauksien osuudet alkionsiirtoa kohti toisen päivän alkionsiirroissa. Implantoituneiden alkioiden osuus on laskettu siirrettyjä alkioita kohti.

<sup>a</sup> Universal pisara vs. ISM1 ( $P = 0,057$ , ei merkitsevä) <sup>b</sup> Universal pisara vs. Universal avo ( $P < 0,01$ )

## 4.2 Alkioiden laatu toisen päivän alkionsiirroissa

Alkioiden laadussa oli merkitseviä eroja ryhmien kesken. Eroja havaittiin erityisesti alkioiden jakautumisnopeudessa, mutta myös blastomeerien tasakokoisuudessa, fragmentoitumisessa ja pakastuskelpoisten alkioiden määrissä. Normaalisti hedelmöittyneiden munasolujen määrä vaihteli jonkin verran ryhmien kesken; osuus oli suurin Universal- ja pienin ISM1 -liuosryhmässä (taulukko VII). Vitrolife -ryhmässä lähes kaikki (98 %) hedelmöittyneet munasolut jakautuivat ja määrä oli muita suurempi, erityisesti verrattuna Universal pisaraviljelyryhmään (89 %). Aikaisin jakautuneita alkioita oli eniten Vitrolife:lla ja Universal avoviljelyssä enemmän kuin pisaraviljelyssä. Monitumaiseksi havaittiin noin kymmenesosa alkioista. Universal pisaraviljelyssä niitä oli

hieman muita enemmän mutta ero ei ollut merkitsevää. Pakastuskelpoisia alkioita oli eniten Vitrolife- ja vähiten ISM1- ryhmässä.

Taulukko VII. Hedelmöittyneiden munasolujen osuudet on IVF:ssä laskettu punktiossa kerättyjä munasoluja kohti, ICSI:ssä kypsiä munasoluja kohti. Jakautuneiden alkioiden osuus on laskettu hedelmöittyneitä munasoluja kohti.

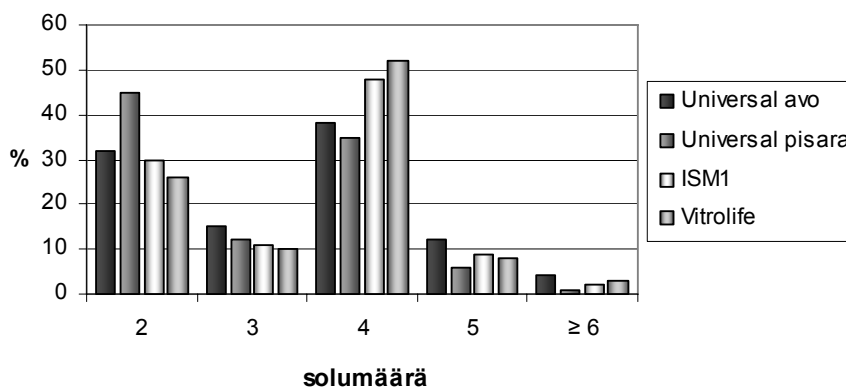
IVF & ICSI D2	Universal IVF avo	Universal IVF pisara	ISM1	Vitrolife
Hedelmöittyneet IVF (%)	449/753 (60 <sup>a</sup> )	-	186/360 (52)	260/481 (54)
Hedelmöittyneet ICSI (%)	191/256 (75)	-	97/134 (72)	100/145 (69)
Jakautuneet (%)	293/326 (90)	280/314 (89)	256/283 (90)	352/360 (98 <sup>b</sup> )
Aikaisin jakautuneet (%)	50/293 (17,1 <sup>c</sup> )	27/280 (9,6)	29/256 (11,3)	89/352 (25,3 <sup>d</sup> )
Monitumaiset alkiot (%)	28/293 (9,6)	35/280 (12,5)	31/256 (12,1)	38/352 (10,8)
Pakastetut alkiot (%)	233/398 (58,5)	162/280 (57,9)	147/256 (57,4)	238/352 (67,6 <sup>e</sup> )

a Universal vs. ISM1 (P < 0,05). b Vitrolife vs. muut (P < 0,001). c Universal avo vs. pisara (P < 0,01).

d Vitrolife vs. muut (P < 0,01). e Vitrolife vs. muut (P = 0,015).

Alkioiden kehitys oli nopeinta Vitrolife -ryhmässä. Merkittävää oli nelisolujen suuri osuus ja kaksi- ja kolmesolujen pieni osuus tässä ryhmässä (kuva 6). Vitrolife -ryhmässä nelisoluisia alkioita oli eniten (52 %) verrattuna Universal avoviljelyyn (38 %) ja pisaraviljelyyn (35 %) (P < 0,001). ISM1 -ryhmässä nelisoluisia alkioita oli 48 %. Universal IVF pisaraviljelyssä alkioit kehittyivät muita hitaammin ja kaksisolujen osuus oli suurin (P < 0,05).

**Alkioiden kehitysvaiheet siirtopäivänä D2**



Kuva 6. Alkioiden solumäärät siirtopäivänä toisen päivän alkionsiirtojen ryhmissä.

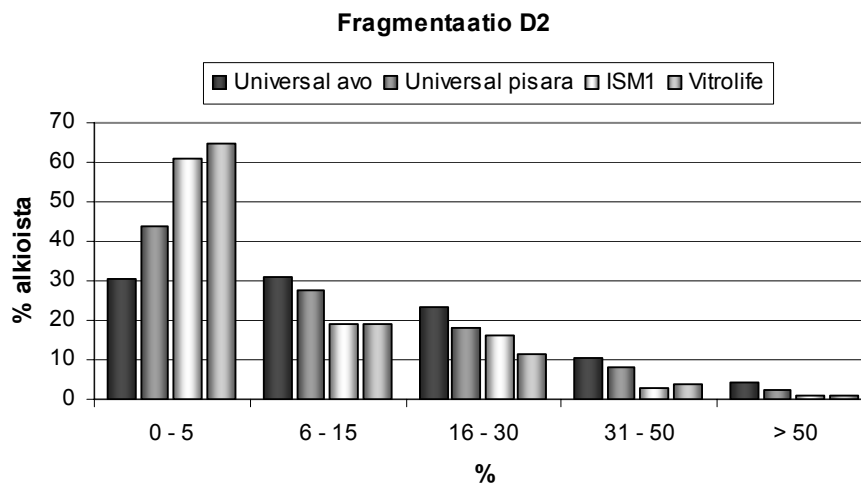
Blastomeerien välisten kokoerojen perusteella alkiot jaettiin kolmeen luokkaan. Universal IVF -liuksella pisaraviljelyn alkioiden oli tasakokoisimmat blastomeerit, avomaljaviljelyn alkioiden sijaan oli tilastollisesti eniten blastomeerien kokoeroja (taulukko VIII).

Taulukko VIII. Alkion blastomeerien kesken ilmenevän kokoeron arviointi kahden päivän ikäisissä alkioiden.

Blastomeerien kokoerot D2	Universal IVF	Universal IVF	ISM1	Vitrolife
	avo	pisara		
0 - 15 %	32,4 % <sup>a</sup>	52,5 %	43,9 % <sup>b</sup>	49,1 %
16 - 30 %	33,8 %	26,1 %	25,5 %	30,4 %
> 30 %	33,8 %	21,4 %	30,6 %	20,5 %

a Universal pisara ja Vitrolife vs. Universal avo ( $P < 0,001$ ). b ISM1 vs. Universal avo ( $P = 0,017$ ).

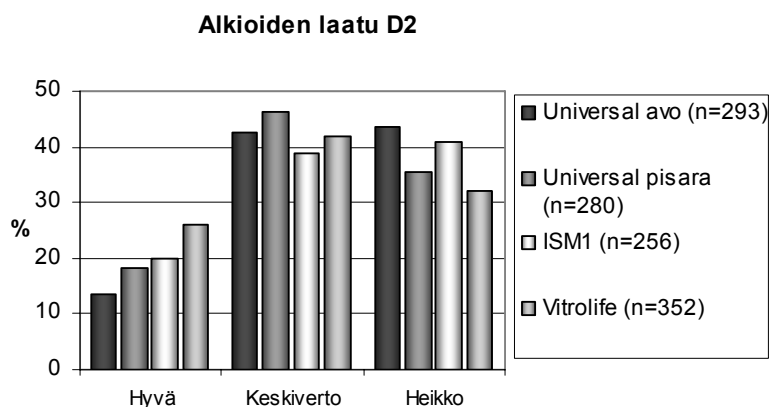
Alkioiden fragmentaatioasteet jaettiin viiteen eri suuruusluokkaan (kuva 7). Fragmentaation määrässä oli ryhmien välillä tilastollisia eroja. Universal avo -ryhmän alkioiden oli enemmän fragmentaatiota verrattuna Vitrolife- ja ISM1 -ryhmiin ( $P < 0,001$ ). Universal IVF -liuksella avomaljaviljelyssä fragmentaatiota esiintyi enemmän kuin pisaraviljelyssä ( $P < 0,05$ ).



Kuva 7. Alkioiden fragmenttisuus toisena kehityspäivänä. Fragmentaatio prosentteina alkion blastomeerien tilavuudesta.

Vitrolife -ryhmissä (sekä D2 että D3) kehittyi käytettyjen parametrien perusteella parempia alkiota kuin muissa ryhmissä, kun otettiin huomioon alkion aikainen jakautuminen, blastomeerien määrä ja fragmentaatio. D2 -ryhmistä Vitrolife:lla oli eniten hyvälaatuisia

alkioita ja vähiten heikkolaatuisia alkioita (kuva 8). Ainoa tilastollisesti merkitsevä ero oli kuitenkin Vitrolife- ja Universal IVF avo -ryhmien välillä ( $P < 0,001$ ).



Kuva 8. Alkioiden yleinen laatu siirtopäivänä kahden päivän ikäisissä alkioissa.

### 4.3 Alkioiden laatu kolmannen päivän alkionsirroissa

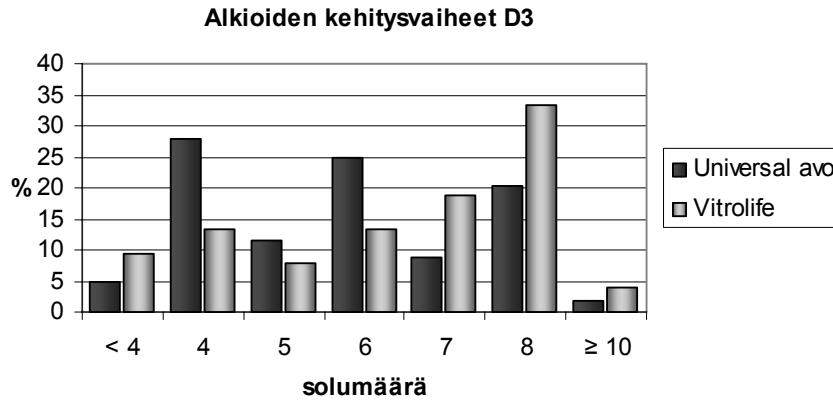
Kolmen päivän alkiot olivat hieman heikkolaatuisempia kuin kahden päivän alkiot D2 -ryhmissä. Hedelmöittymis- ja jakautumisprosentit sekä pakastuskelpoisten alkioiden määrät olivat kuitenkin samaa luokkaa D2 -ryhmien kanssa. Vitrolife:n kohdalla ilmeni suuri ero IVF:llä ja ICSI:llä hedelmöittymisen välillä, mikä voi joukon pienen koon vuoksi olla sattumaa (taulukko IX). Keskimäärin hedelmöittymisissä ei ollut eroja. Jakautuneiden ja pakastuskelpoisten alkioiden määrät olivat myös ryhmien kesken samaa tasoa.

Taulukko IX. Hedelmöittyneiden, jakautuneiden ja pakastuskelpoisten alkioiden määrät.

IVF & ICSI D3	Universal IVF avo	Vitrolife
Hedelmöittyneet IVF (%)	64/96 (67)	57/135 (42)
Hedelmöittyneet ICSI (%)	43/66 (65)	23/26 (88)
Jakautuneet (%)	104/107 (97)	75/80 (94)
Pakastetut alkiot (%)	63/104 (61)	47/75 (63)

Vitrolife -ryhmässä alkioiden kehitys oli nopeampaa ja olennaisesti 8 -soluisia oli enemmän Vitrolife- (33 %) kuin Universal -ryhmässä (20 %) (kuva 9). Vitrolife -ryhmän

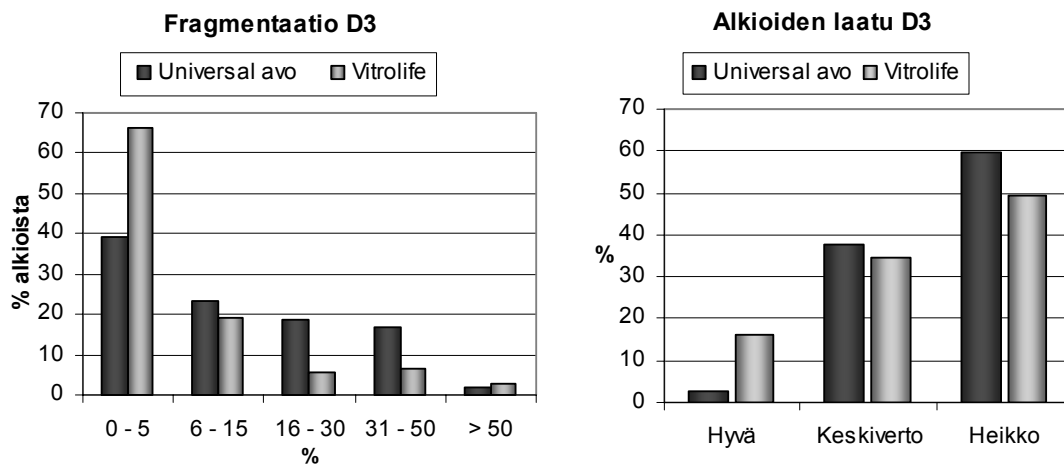
alkioissa blastomeerit olivat hieman tasakokoisempia, mutta erot olivat pieniä (taulukko X). Samoin niissä oli vähemmän fragmentaatiota kuin Universal -ryhmässä ja yleinen laatu oli parempi (kuva 10).



Kuva 9. Alkioiden solumäärät siirtopäivänä kolmannen päivän alkionsiirtojen ryhmissä. 8-soluisten alkioiden osuus on suurempi Vitrolife -ryhmässä ( $P < 0,05$ ).

Taulukko X. Alkion blastomeerien kesken ilmenevän kokoeron arviointi kolmen päivän ikäisissä alkioiden

Blastomeerien kokoerot D3	Universal IVF avo	Vitrolife
(0 - 15 %)	24,5 %	25 %
(16 - 30 %)	44,1 %	48,5 %
(> 30 %)	31,4 %	26,5 %



Kuva 10. Alkioiden fragmentaatio ja laatu siirtopäivänä. Vitrolife:lla oli vähemmän fragmentoituneita alkiota ( $P < 0,01$ ), enemmän hyvä- ja vähemmän heikkolaatuisia alkiota kuin Universal:lla ( $P < 0,01$ ).

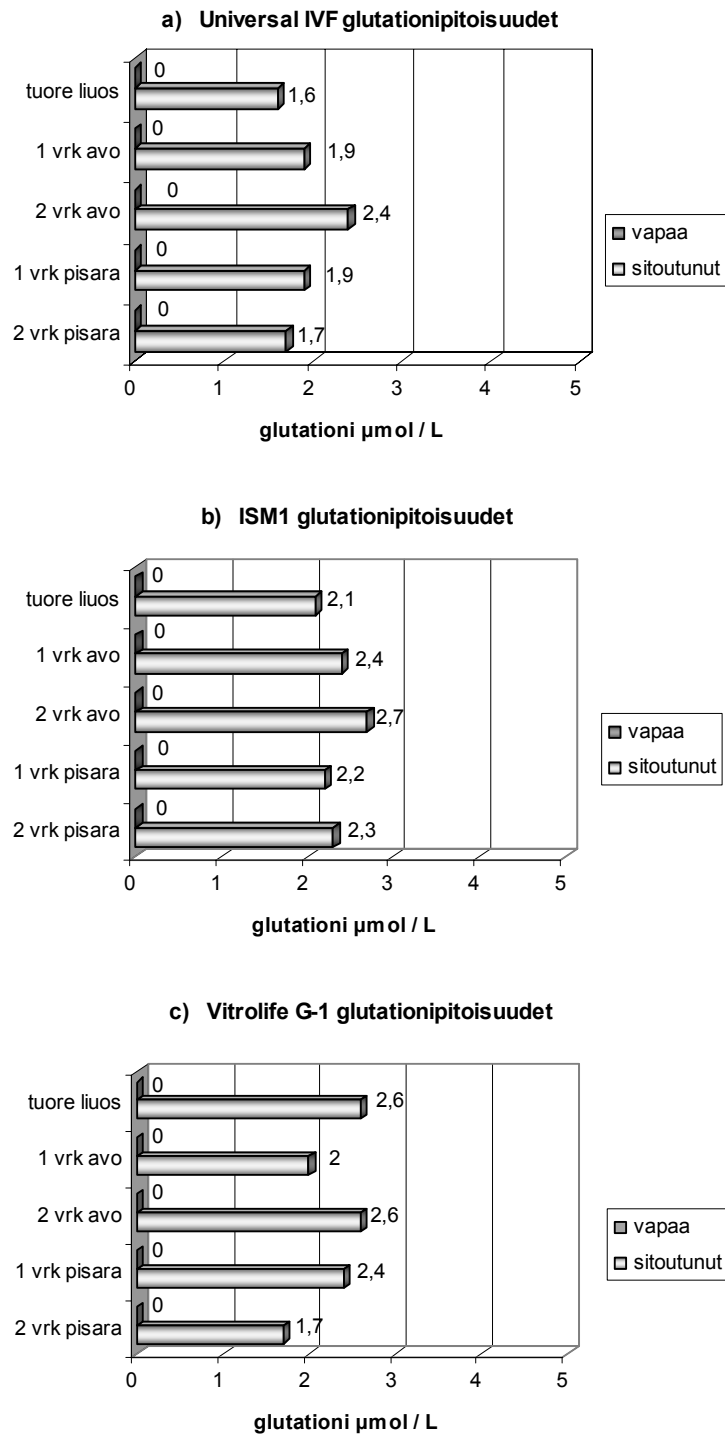


#### 4.4 Tioli- ja nukleotidipitoisuudet

Tuoreiden liuosten lähtöpitoisuuksissa oli eroja glutathionin, kysteiinin ja hypoksantiinin suhteen. Keskikuoppamalja- ja pisaraviljelyssä havaittiin myös eroja tiolien pitoisuuksissa. Muiden aineiden (ATP, NAD) mittaustuloksia ei käsitelty tietojen puutteellisuuden vuoksi. Samasta syystä alkioille käytetyt liuokset jätettiin varsinaisina tuloksina käsittelemättä.

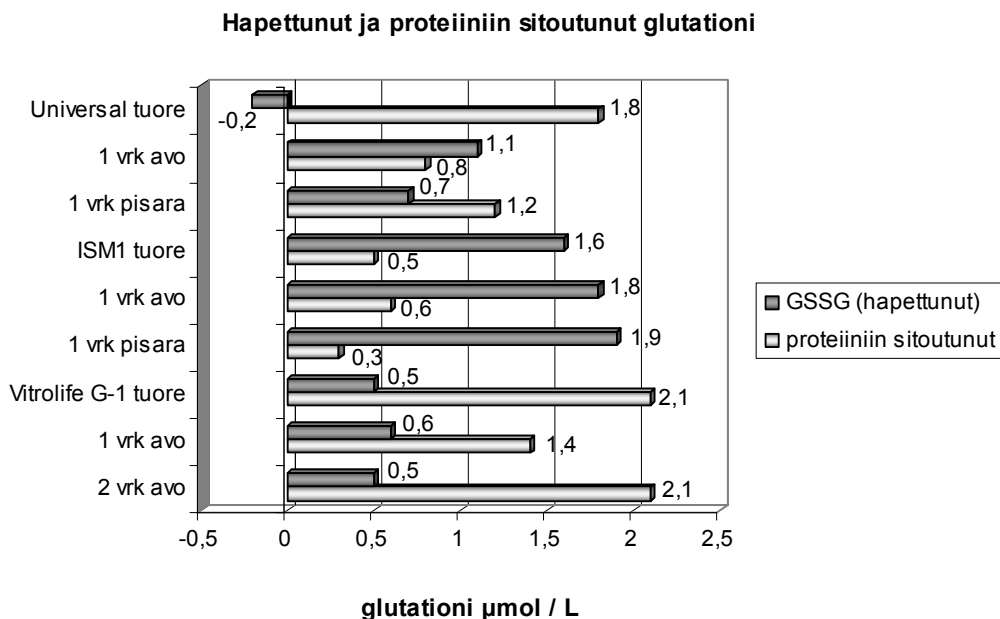
Seuraavissa taulukoissa vapaan tiolin määrällä tarkoitetaan pitoisuuksia ilman DTT:tä käsitellyissä näytteissä. Sitoutunut osuus tioleista taas on DTT -käsitelyssä pelkistynyt eli vapautunut osa tioleja. Tuntematon osa käytettyjen liuosten sitoutuneesta glutathionista on hapettunutta glutathionia (GSSG), jossa on tosiasiaa kaksi glutathionia sitoutuneena toisiinsa. Happokäsiteltyjen näytteiden kohdalla (käyttämättömät ja ilman alkioita viljellyt liuokset) tarkoitus oli selvittää proteiineihin sitoutuneen tiolin osuutta. Näistä näytteistä vapautuvat vain pienissä molekyyleissä kiinni olevat tiolit. Proteiineihin sitoutuneen tiolin osuutta selvitetään happokäsitellyn ja ilman happoa käsitellyn näytteen mittaustulosten erotuksella. Happokäsiteltyjä näytteitä on käsitelty vain kuvissa 12 ja 13. Muut näytteet on käsitelty vain DTT:llä tiolien pelkistämiseksi.

Tuoreiden liuosten glutathionipitoisuudet vaihtelivat hieman liuosten kesken (kuvat 11 a-c). Vapaata, pelkistynyttä GSH:ta ei ollut liuksissa lainkaan ennen alkioviljelyä. Tuoreessa Universal IVF -liuksessa oli kolmesta liuksesta vähiten kokonaisglutathionia (kuva 11 a). ISM1:ssä glutathionin määrä lisääntyi hieman kolmanteen viljelypäivään mennessä (kuva 11 b). Sitoutuneen glutathionin osuus kasvoi hieman viljelyssä ilman alkioita Universal IVF ja ISM1 -liuksissa. Vitrolife:n kohdalla näin ei käynyt, vaikka kokonaisglutathionin pitoisuus olikin tässä liuksessa suurin (kuva 11 c). Vapaata glutathionia ei ilmaantunut liuksiin lainkaan ja sitoutuneenkin glutathionin pitoisuudet säilyivät lähes muuttumattomina. Toisaalta pisaroissa sitoutuneen glutathionin pitoisuus oli hieman pienempi kuin avomaljalla.



Kuva 11. Vapaan (GSH) ja sitoutuneen (tai hapettuneen) glutationin pitoisuudet liuoksissa a) Universal IVF, b) ISM1 ja c) Vitrolife G-1. Näytteet otettu tuoreesta ja 1-2 vuorokautta soluviljelykaapissa viljellystä liuoksesta. 1 vrk viljely vastaa ajallisesti toiseen päivään (D2) tehtyä alkioiden viljelyä, 2 vrk kolmanteen päivään tehtyä (D3) viljelyä.

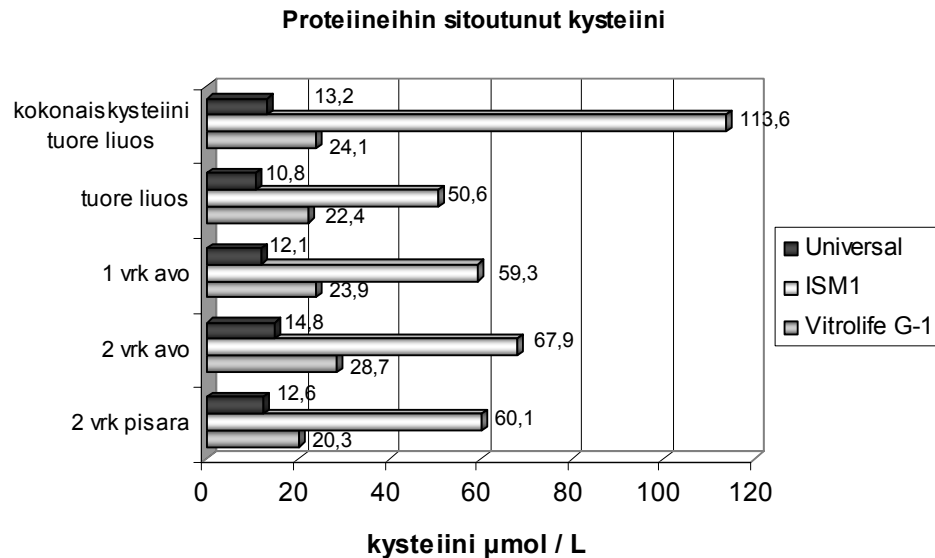
Hapettuneen glutationin (GSSG) määrä vaihteli liuosten kesken (kuva 12). Universal:ssa sen pitoisuus nousi enemmän avomaljalla kun taas pisaroissa oli enemmän proteiineihin sitoutunutta glutationia. Universal IVF -luoksen GSSG -lähtöpitoisuuden mittausta epäonnistui. Arvon oletettaisiin olevan lähellä muista liuoksista mitattuja. ISM1 -liuoksessa hapettuneen glutationin (GSSG) ja myös kokonaisglutationin pitoisuudet olivat suurimmat, proteiineihin sitoutuneen glutationin pitoisuudet sen sijaan pienimmät. Vitrolife:n liuoksessa päinvastoin proteiiniin sitoutuneen glutationin pitoisuus oli kolmesta liuoksesta suurin. Hapettuneen glutationin määrä sen sijaan ei kasvanut soluviljelykaapissa kahdessaakaan vuorokaudessa.



Kuva 12. Hapettuneen (GSSG) ja proteiineihin sitoutuneen glutationin osuudet ei -vapaasta glutationista. GSSG sisältää kaksi toisiinsa sitoutunutta, hapettunutta glutationia. Näytteet on otettu tuoreista ja ilman alkioita viljellyistä liuoksista. GSSG:n pitoisuudet on laskettu DTT:llä ja ilman DTT:tä käsitellyistä, happokäsitellyistä näytteistä eli niiden erotuksena. Proteiineihin sitoutuneen glutationin osuus on laskettu vähentämällä kokonaisglutationista vapaan tiolin ja GSSG:n osuus.

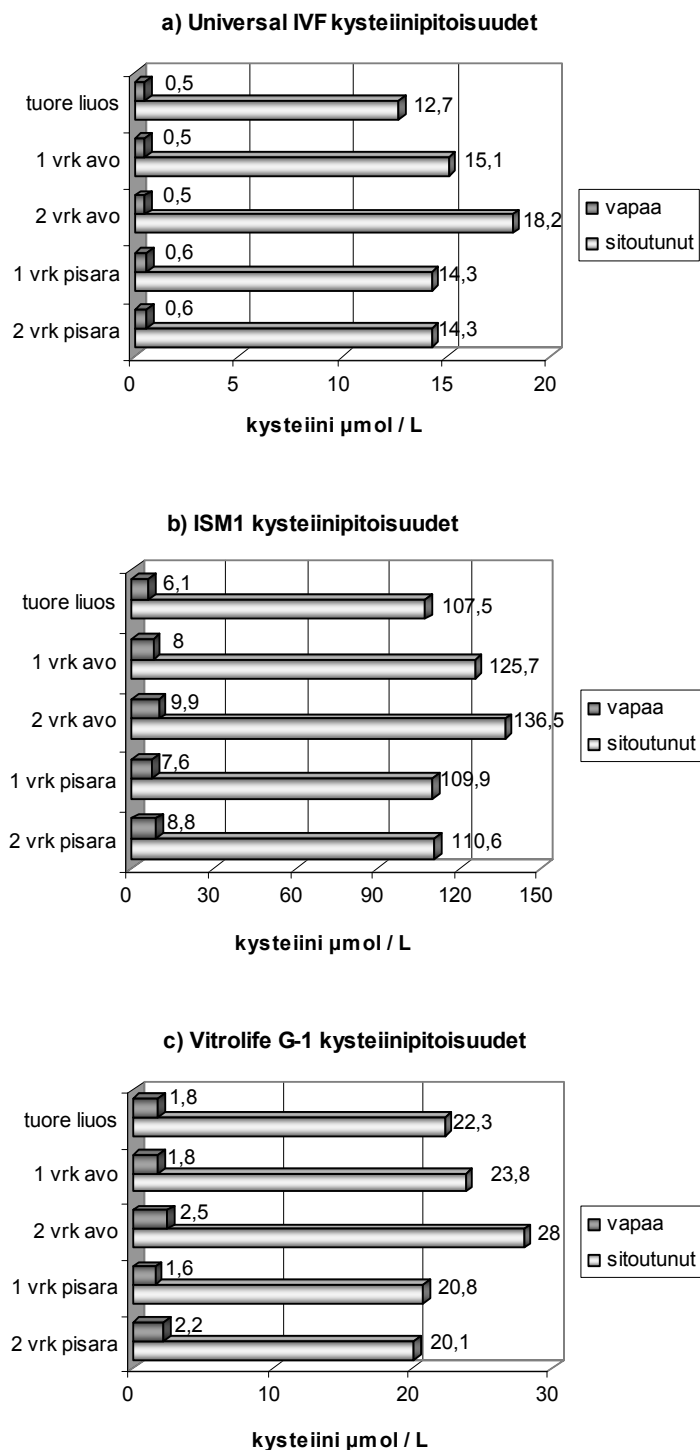
ISM1 -liuokseen lisätty metioniini vaikuttaa myös kysteiinin pitoisuuksiin. Kysteiinin lähtöpitoisuus oli tässä liuoksessa kymmenkertainen Universal -liuokseen verrattuna. Proteiiniin sitoutuneen kysteiinin pitoisuuksissa on kaikkien liuosten kohdalla nähtävissä sama kehitys: pitoisuus kasvaa viljelyssä ilman alkioita toista vuorokautta kohti, mutta pisarassa hieman vähemmän kuin avomaljalla (kuva 13). Kysteiinin, kuten glutationinkin,

sitoutuminen proteiineihin kertoo hapettumisesta. Muu kuin proteiiniin sitoutunut kysteini on pienempiin molekyyliin sitoutunutta. Kahden kysteinin muodostama hapettunut muoto on kystiini.



Kuva 13. Kokonaiskysteini tuoreissa liuoksissa ja proteiineihin sitoutuneen kysteinin osuudet ilman alkioita 1-2 vuorokautta viljellyissä liuoksissa. Kokonaiskysteiniinistä on vähennetty vapaa ja DTT:llä irronnut, pieniin molekyyliin (kuten kystiini) sitoutuneen kysteinin osuus. Jäljelle jäävä pitoisuus on suuriin molekyyliin (proteiineihin) sitoutuneen kysteinin osuus.

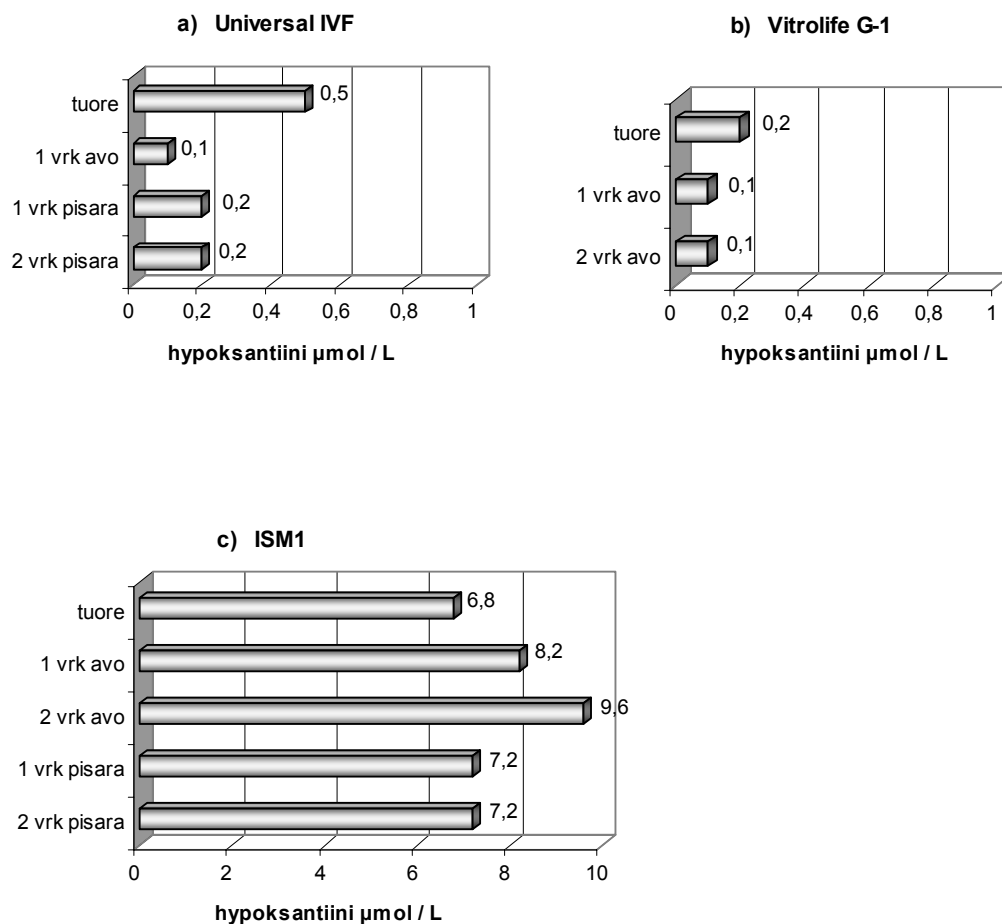
Kysteinin suhteen liuokset näyttivät käyttäytyvän yhtenäisesti. Vapaata kysteiniä oli liuoksissa keskimäärin 3 - 15 % kokonaiskysteiniinistä ja sen määrä kasvoi viljelyn aikana. Viljelykaapissa sekä vapaan että sitoutuneen kysteinin pitoisuudet kasvoivat kaikissa liuoksissa enemmän avomaljalla, vapaan kysteinin osuus taas enemmän pisaroissa. Kaikissa liuoksissa sitoutunutta kysteiniä oli keskimäärin vähemmän pisara- kuin avomaljaviljelyssä. Kokonaiskysteinin pitoisuus oli pienin Universal IVF:ssä (kuva 14 a). Tässä liuoksessa vapaan kysteinin määrä ei muuttunut viljelyssä ilman alkioita. Vapaan ja sitoutuneen kysteinin suhde tosin oli hieman parempi pisarassa ilman alkioita verrattuna avomaljaan. ISM1:ssä sekä vapaata että sitoutunutta kysteiniä oli liuoksista eniten, vapaata keskimäärin nelinkertaisesti ja sitoutunutta jopa lähes kymmenkertaisesti muihin verrattuna (kuva 14 b). ISM1- ja Vitrolife G-1 -liuoksissa taas pitoisuudet olivat lähtökohtaisesti korkeammat (kuva 14 b ja c). Myös Vitrolife G-1:ssä kysteiniipitoisuudet kasvoivat avomaljalla enemmän kuin pisaroissa.



Kuva 14. Kysteiniipitoisuudet tuoreessa liuoksessa ja 1-2 vuorokautta (ilman alkioita) viljellyssä liuoksessa. a) Universal IVF, b) ISM1, c) Vitrolife G-1 PLUS. Vapaa kysteini on ilman DTT-käsittelyä mitattu pitoisuus, sitoutunut kysteini on DTT:llä pelkistämällä vapautunut kysteini. Huomaa erisuuruiset numeroasteikot taulukoiden x -akselilla.

Hypoksantiinin pitoisuudet olivat ISM1 -ssä moninkertaiset muihin liuoksiin verrattuna. Sen sijaan Universal IVF- ja Vitrolife G-1 -liuosten hypoksantiinitasot olivat lähempänä toisiaan, Vitrolife:n liuoksessa pienimmät (kuva 15).

Universal IVF:ssä (kuva 15 a) hypoksantiinin määrä väheni viljelyssä ilman alkioita. Vitrolife G-1:ssä (b) hypoksantiinin lähtöpitoisuuskin oli pieni ja pieneni edelleen viljelyssä. ISM1 -liuoksessa (c) hypoksantiinin määrä kasvoi avomaljaviljelyssä ilman alkioita, erityisesti toiseen päivään mennessä. Pisaramaljalla samantasoista kasvua ei ollut havaittavissa.



Kuva 15. Hypoksantiinin pitoisuudet tuoreissa ja 1-2 vrk (ilman alkioita) viljellyissä liuoksissa. Universal IVF (a), Vitrolife G-1 PLUS (b) ja ISM1 (c). Huomaa erisuuruiset numeroasteikot taulukoiden x -akselilla.

## 5. Tulosten tarkastelu

Viljelyliuosten koostumuksissa on merkittäviä eroja, joiden on ajateltu vaikuttavan hoitojen tuloksiin. Kaikki liukset on kehitetty luomaan hyvät edellytykset alkioiden kehitykselle, mutta osittain erilaisten ominaisuuksien avulla. Hyvät olosuhteet tukevat normaalia aineenvaihduntaa ja kehitystä, huonot heikentävät niitä. Viljelyolosuhteet koostuvat liuksen ohella monista muistakin tekijöistä, kuten teknisistä menetelmistä.

Kuten monissa aiemmissa tutkimuksissa, tässäkin vertailussa havaittiin merkitseviä eroja sekä erilaisten liuosten että viljelymenetelmien kesken. Pesaraviljelyssä vaikuttaa olevan etuja verrattuna viljelyyn keskikuoppamaljalla. Toisaalta vain yhtä liuosta (Universal IVF) verrattiin näiden erilaisten viljelymenetelmien osalta. Kahdesta muusta käytetystä liuksesta ei ole vastaavia vertailutuloksia, mikä vähentää pesaraviljelystä tehtävien päätelmien luotettavuutta. Selvimät erot nähtiin eri liuosten välillä alkioiden laadun suhteen. Alkioiden määrä oli suuri, joten alkoiden laadussa nähtyjä eroja ryhmien kesken voidaan pitää luotettavina tuloksina. Vitrolife GIII -sarja näyttäisi olevan vertailuista liuksista paras tukemaan alkioiden kehitystä kahden ja kolmen vuorokauden pituisessa viljelyssä. Yksi tutkimuksen syistä olikin vertailla alkioiden kehitystä kolmanteen päivään eri liuksissa. Vitrolife näyttää olevan Universal IVF -liuosta tehokkaampi myös kolmen vuorokauden viljelyssä.

Hyvien alkioiden kehittymistä voi pitää merkittävänä tuloksena, koska alkioiden laatu on tärkeää raskauden alkamisen todennäköisyyden kannalta. Raskaustulokset eivät ensimmäisten alkionsiirtojen perusteella välttämättä korreloi alkioiden keskimääräisen laadun kanssa, sillä alkioita siirretään usein vain yksi. Pakastettujen alkioiden siirrot antavat jälkeenpäin lisätietoa alkioiden kyvystä saada raskaus aikaan.

Universal IVF pesaraviljelyssä alkioiden jakautuminen oli kaikista ryhmistä hitainta, mutta raskauksia alkoi eniten. Kuitenkin tässä ryhmässä kaikissa raskauteen johtaneissa yhden alkion siirroissa oli 4-5 -soluinen alkio. Tästä syystä hyvät raskaustulokset eivät ole niin

yllättäviä, kuin pelkästään alkioiden hidas jakautuminen antaisi ymmärtää. Vitrolife GIII -ryhmässä oli paras alkioiden jakautumisnopeus ja laatu ja raskauksia alkoi toiseksi eniten. Tämän liuoksen koostumus on voinut vaikuttaa alkioiden hyvän morfologian kehittymiseen. ISM1 -liuosryhmässä alkioiden laatu oli keskitasoa ja nelisoluisia alkioita oli toiseksi eniten, mutta kliinisiä raskauksia oli vähiten. Lopulta ainoa tilastollisesti merkitsevä ero nähtiin jatkuvissa raskauksissa, joiden osalta Universal IVF -pisaraviljelyryhmä oli paras.

Pisaraviljelyssä on ennenkin saatu parempia raskaustuloksia avomaljviljelyyn verrattuna. Petersen ym. (2005) tekemässä ICSI -hoitojen tutkimuksessa oli pisaraviljelyryhmässä enemmän implantoituneita alkioita. Ero Universal IVF -ryhmien raskaustulosten välillä oli yllättävän suuri, kun ainoana erona oli viljelyliuoksen käyttömenetelmä. Raskaustuloksissa voisi ajatella olevan pienistä potilasmääristä johtuva vääristävä vaikutus. Vaikka lapsettomuuden syyt ja hoidot olivatkin tasaisia ryhmien kesken, on niissä saattanut olla raskauden todennäköisyyden kannalta hieman erilaiset potilasjoukot. Pakastetun alkion siirtojen jälkeen saaduista yhdistetyistä raskaustuloksista on mahdollisuus saada enemmän tietoa alkioiden laadun ja raskauksien yhteydestä ja luotettavampia tuloksia eri ryhmien vertailusta. Pakastuskelpoisten alkioiden määrällä ja laadulla on myös vaikutusta näihin raskaustuloksiin. Vitrolife -ryhmästä saatiin eniten pakastuskelpoisia alkioita, mikä voi parantaa yhtä hoitokertaa kohden laskettavia kumulatiivisia raskaustuloksia jatkossa.

Suurin osa raskauksista alkoi nelisoluisien alkioiden siirroista, mikä vastaa aiempien tutkimusten tuloksia. Normaali jakautumisnopeus on tärkeimpiä tekijöitä alkion kehityksessä ja voi ennustaa parempia raskaustuloksia alkioiden morfologisesta laadusta riippumatta. Nelisoluisen alkion toisena kehityspäivänä ja 8 -soluisen kolmantena päivänä katsotaan olevan optimaalisia (Ziebe ym., 1997; Vilska ym., 1999; Magli ym., 2001), mikä on nähtävissä useassa muussakin liuosvertailututkimuksessa. Vitrolife -ryhmissä nähty muita parempi alkioiden jakautumisnopeus on siis itsessään hyvä merkki.

Liuosvertailujen tulokset vaihtelevat toisinaan laboratorioden kesken samallakin liuoksella. Pelkästään laboratorion kannalta vertailuissa saattavat vaihdella soluviljelykaappien happi- ja hiilidioksidipitoisuudet, työtavat, välineet ja siittiöiden



käsittely. Aikaisempien vastaavien vertailujen tulokset ovat enimmäkseen olleet yhteneväisiä tämän vertailun kanssa. Erb ym. (2004) saivat ISM1:llä (MediCult) enemmän hyvälaatuisia alkioita ja enemmän nelisoluisia alkioita toisena kehityspäivänä verrattuna vanhempaan Universal IVF -liuokseen (MediCult). Ludwig ja Nitz (2004) raportoivat paremmista raskaustuloksista Vitrolife GIII -sarjan liuksilla verrattuna Universal IVF -liuokseen. Eräässä vertailututkimuksessa MediCult:n liuksilla saatiin väliraportin mukaan paremmin jakautuvia ja enemmän blastokystivaiheeseen kehittyneitä alkioita verrattuna Vitrolife:n liuksiin (Lambert ym., 2005). Syyksi ehdotettiin mm. erilaista lisätyn seerumiproteiinin lähdettä, joka on MediCult:n liuksissa pääasiallisesti HSA, Vitrolife:n liuksissa rHA.

Vitrolife:n uudella liuossarjalla GIII on saatu parempia tuloksia jakautumisnopeuden, alkoiden laadun ja raskaustulosten suhteen kuin saman valmistajan vanhemmalla liuossarjalla (G1.2/G2.2) tuoreiden ja pakastettujen alkoiden siirroista (Balaban & Urman, 2005). Nämä liuossarjat on kehitetty alkoiden blastokystivaiheen viljelyyn, mitä ei tämän tutkimuksen hoidoissa tehty. Pidempi viljely olisi saattanut edelleen vaikuttaa tuloksiin. Aiemmin G1.2/G2.2 -liuossarja (Vitrolife) ja MediCult:n BlastAssist M1/M2-liuokset johtivat vertailussa yhtäläisiin raskaustuloksiin (Zollner ym., 2004), vaikka Vitrolife -ryhmässä tsygoottien ja ICSI -alkoiden laatu arvioitiin paremmaksi. Tässäkään ei siis ryhmän alkoiden keskimääräinen laatu ollut suoraan yhteydessä raskaustuloksiin. Liuos ei vaikuttanut merkittävästi lopputulokseen ainakaan vielä tuoreiden alkoiden siirroissa. Osassa tutkimuksia viljelyliuosten ei ole havaittu vaikuttavan alkoiden laatuun eikä raskaustuloksiin (Mauri ym., 2001). Edelleen tietyn liuoksen käyttö voi parantaa alkoiden laatua vaikuttamatta raskaustuloksiin (Aoki ym., 2005; Zollner ym., 2004). Toisten tutkimusten perusteella taas viljelyliuoksen valinnalla on vaikutusta alkoiden jakautumisnopeuteen (Staessen ym., 1998) tai sekä jakautumisnopeuteen, laatuun että fragmentaatioon (Cooke ym., 2002). Liuoksesta johtuvaa eroa on havaittu useassa tutkimuksessa sekä alkoiden laadun että raskaustulosten suhteen (Van Langendonck ym., 2001).

Useissa tutkimuksissa on mitattu tiolipitoisuuksia eri nisäkkäiden munasoluista ja alkioista mutta harvemmin viljelyliuoksista. Tässä tutkimuksessa liuosten tiolipitoisuudet olivat mittausten mukaan pienempiä kuin muissa tutkimuksissa. Näytteet onkin otettu liuoksista, ei itse alkioista. Solunsisäiset tiolipitoisuudet vaihtelevat jonkin verran lajin mukaan mutta ovat huomattavasti pienempiä solun ulkopuolella, mikä osaltaan selittää liuosmittausten pieniä pitoisuuksia. Solun ulkopuolisen kysteiinin ja glutationin pitoisuudet ovat yhteydessä toisiinsa ja solun sisäisiin pitoisuuksiin munasoluissa ja alkioidissa. GSH:n lisääminen liuokseen 0,5 mM pitoisuudessa lisäsi sian munasolujen glutationipitoisuutta (Boquest ym., 1999). Solunsisäinen GSH seurasi solunulkoista myös naudan munasoluilla tehdyssä tutkimuksessa. 1 mM glutationi nosti solunsisäisen GSH:n 1,6 -kertaiseksi (4,8 pmol/solu, noin 23 mM) verrattuna liuokseen ilman GSH:ta. 10 mM GSH -pitoisuus nosti sen jo 2,8 -kertaiseksi (8,4 pmol/solu) ja heikensi alkioiden kehitystä (Kim ym., 1999). Erittäin runsaina sekä glutationi että kysteiini ovat alkiolle haitallisia. Ihmisen alkiolla haitallisuuden raja-arvoja ei kuitenkaan ole tiedossa.

Monet tutkimukset ovat osoittaneet kysteiinin lisäävän solujen glutationipitoisuutta. Kysteiini 0,04-0,57 mM pitoisuudessa lisäsi sian munasolujen GSH-pitoisuutta (Yoshida ym., 1993). Jo 0,14 mM kysteiinilisäyksen vaikutus vastasi munasoluissa GSH:n pitoisuutta *in vivo*. Ilman kysteiiniä GSH sen sijaan väheni, mikä on luonnollinen ilmiö. Kysteiini ja GSH ovat tärkeitä liuoksen ainesosia GSH:n ylläpidossa ja siis pelkistyspotentiaalin kannalta. Optimaaliset pitoisuudet voivat toisaalta olla lajikohtaisia. Myös de Matos & Furnus (2000) havaitsivat kysteiinin tai kystiinin lisäämisen (0,6 mM) nostavan GSH:n pitoisuutta naudan hedelmöittyneissä munasoluissa lähes kaksinkertaiseksi kontrolliin verrattuna. GSH:n lisääminen viljelyliuokseen (1 mM) yhdessä kystiinin kanssa (50 µM) edistää hiiren alkioiden kehitystä (Gardiner & Reed, 1994; Gardiner ym., 1998). Glutationi voi myös hajota liuoksessa ja muodostua uudelleen solussa.

Tässä tutkimuksessa glutationin ja kysteiinin pitoisuudet eivät itsessään korreloineet keskenään. Kaikkien kolmen liuoksen glutationipitoisuudet olivat lähellä toisiaan. Sen sijaan kysteiinin pitoisuuksissa oli suuria eroja. Toisaalta kaikissa liuoksissa glutationi- ja

kysteiinipitoisuudet olivat samalla tavoin riippuvaisia viljelymenetelmästä. Avomaljalla hapettuneen eli sitoutuneen tiolin pitoisuus kasvoi enemmän kuin pisarassa.

Pelkistyneen ja hapettuneen tiolin suhteen pieneneminen kertoo oksidatiivisesta stressistä. Gardiner ja Reed (1994) aiheuttivat kemiallisesti (peroksidilla) oksidatiivista stressiä hiiren alkioihin, mikä aiheutti GSH:n huomattavan vähenemisen alkioista mitattuna nostoen samalla GSSG:n ja GSS-proteiinin pitoisuuksia. Bedaiwy ym. (2004) tekivät määrytyksiä ihmisalkioiden viljelyliuoksista ensimmäisen viljelypäivän jälkeen. Tärkein tulos oli kasvaneiden happiradikaalipitoisuuksien yhteys alkioiden huonompaan laatuun ja raskaustuloksiin.

Tässä tutkimuksessa alkioille käytetyistä liuoksista tehtiin alustavia määrytyksiä, joiden tuloksia voi pitää suuntaa antavina [tietoja ei esitetty]. Näissä näytteissä alkioille hyödyllistä vapaata glutationia oli ilmestynyt jonkin verran liuoksiin heti kun alkioita oli viljelyssä. Universal IVF -liuoksessa oli havaittavissa joitakin viitteitä alkioiden laadun ja tiolipitoisuuksien yhteydestä. Alkioviljelyn jälkeen heikkojen alkioiden maljoilla oli hieman vähemmän vapaata glutationia (0,4-0,5  $\mu\text{M}$ ) kuin keskivertoalkioiden maljoilla (0,63-0,93  $\mu\text{M}$ ). Myös vapaan ja sitoutuneen kysteiinin suhde näytti kaikissa liuoksissa olevan parempi hyvälaatuisten alkioiden kohdalla. Universal IVF:ssä hypoksantiini lisääntyi lähtöpitoisuuteen asti erityisesti heikkolaatuisten alkioiden viljelyssä kun taas pelkkää liuosta viljellessä sen määrä väheni. ISM1:ssä taas hypoksantiinin määrä lisääntyi vain viljellessä liuosta avomaljalla. Sekä näytteistä mitatut pitoisuudet että pitoisuuserot olivat pieniä, mikä vähentää näiden tulosten merkitystä, mutta antaa silti aihetta lisätutkimuksille. Liuoksissa tapahtuvien muutosten tutkiminen hedelmöitystavan (IVF ja ICSI), kehitysvaiheen ja alkioiden laadun mukaan olisi mielenkiintoista liuosten kehittelyn ja perustutkimuksen kannalta. Tässä tutkimuksessa kaikkia liuoksia viljeltiin ilman alkioita sekä avomaljalla että pisarassa. Suuntaa antavina tuloksina voisi pitää eroja pisara- ja avomaljaviljelyn välillä.

Liuosten vapaan ja sitoutuneen kysteiinin suhde ja GSH-pitoisuus kasvavat alkioita viljellessä, mikä kertoo alkioiden kyvystä vastustaa hapettumista. Kaikilla liuoksilla vapaan kysteiinin suhde sitoutuneeseen oli suurempi pisarassa kuin keskikuoppamaljalla

ilman alkioita viljellessä. Sitoutuneen glutatationin ja kysteiinin pitoisuudet olivat niin ikään hieman pienemmät pisara- kuin avomaljaviljelyssä. Kaikissa liuoksissa myös kokonaiskysteiini lisääntyi avomaljalla mutta ei pisarassa, minkä voisi ajatella olevan hyvä merkki hapettumisen suhteen. Vitrolife:lla vapaan kysteiinin määrän kasvu kolmanteen päivään mennessä voi olla hyvä merkki eikä siltä osin viittaa oksidatiivisen stressin lisääntymiseen. Hypoksantiinia taas oli tässä liuoksessa vähiten eikä se lisääntynyt viljelyn aikana, mikä on luultavasti osaltaan merkki normaalista aineenvaihdunnasta.

Universal IVF -liuoksesta löytyivät suurimmat pelkistyneiden tiolien pitoisuudet suhteessa hapettuneisiin. Alkioiden heikompi laatu ei siis näiden alustavien mittausten perusteella johdu muita liuoksia herkemmästä hapettumisesta. Kokonaisglutatationia oli eniten tuoreessa Vitrolife G-1 -liuoksessa. Vapaata glutatationia ei kuitenkaan ollut lainkaan huolimatta siitä, että liuoksen EDTA periaatteessa estää GSH:n hapettumista. Glutatationi ei siis tässä tutkimuksessa näytä liittyvän alkioiden menestykseen. Todennäköisesti glutatationia myös hapettui näytteiden keräämisen ja käsittelyn aikana. Tiolit hapettuvat herkästi ja liuosnäytteiden pakastaminen saattoi vaikuttaa näytteisiin ja sitä kautta mittaustuloksiin. Kaikki näytteet käsiteltiin kuitenkin keskenään samalla tavalla joten ne ovat vertailukelpoisia.

Tuore ISM1 sisältää yllättäen muita liuoksia enemmän hypoksantiinia (6,8 vs. 0,2-0,5  $\mu\text{M}$ ). Lisäksi kahden vuorokauden säilytys keskikuoppamaljalla soluviljelykaapissa sai ISM1:n hypoksantiinin lisääntymään 9,6  $\mu\text{M}$  pitoisuuteen kun vastaava luku Vitrolife G-1:ssä oli 0,1  $\mu\text{M}$ . Muissa liuoksissa hypoksantiinin määrä siis väheni viljelyssä, ISM1:ssä se lisääntyi selvästi. ISM1 -liuoksen nukleotidit voivat selittää hypoksantiinipitoisuuden kasvun. Toisaalta on yllättävää, että vaikutus olisi niin suuri ilman alkioita. Hypoksantiinin kertyminen on merkki puriin nukleotidien hajoamisesta ja on tutkimusten mukaan haitallista. Hiiren alkioihin verrattuna ihmisen alkioit tosin eivät ole yhtä herkkiä. Loutradis ym. (1987) osoittivat hypoksantiinin aiheuttavan hiirillä alkionkehityksen pysähtymistä kaksisoluvaiheeseen jo 6, 15 ja 30  $\mu\text{M}$  pitoisuuksissa. Toisen tutkimuksen mukaan sama ilmiö alkoi näkyä jo alkaen 30 nM hypoksantiinin pitoisuudessa kun liuoksessa oli 5,5 mM glukoosia mukana (Downs & Dow, 1991). Toisaalta glutamaatti ja laktaatti liuoksessa estivät tätä haittavaikutusta. Nykyään niitä molempia on useimmissa viljelyliuoksissa.

Liuosten koostumuserot voivat olla tästäkin vertailusta saatujen tulosten takana. Universal IVF on vertailun liuksista yksinkertaisempi perusliuos. Vitrolife G-1 on monimuotoisempi liuos, johon on lisätty kelatoivaa EDTA:ta, stabiilia alanyyliglutamiinia ja tauriinia. ISM1:ssä on vitamiineja, nukleotideja ja metioniinia, jota on lisätty epigeneesin ylläpitämiseksi ja hapettumisen ehkäisemiseksi. Liuosnäytteistä ilmenneistä suurista kysteiinipitoisuuksista päätellen joko metioniinia tai itse kysteiiniä on ollut liuoksessa verraten runsaasti. Glutacionipitoisuuden kasvu ISM1 -liuoksessa saattaa johtua suuresta kysteiinipitoisuudesta, sillä glutationi toimii kysteiinin varastona erityisesti jos kysteiiniä on liikaa.

Hapettumista näyttäisi tapahtuvan liuksissa itsestään ilmakehän happipitoisuudessa. Muutoksia ilmenee jo sellaisenaan soluviljelykaapissa, mikä tulisi ottaa huomioon liuoksen säilytysvaiheessa ennen käyttöä. Vitrolife G-1 -liuosta lukuunottamatta hapettuneen glutacionin (GSSG) pitoisuus kasvoi ilman alkioitakin. Happipitoisuudella on viljelyolosuhteissa todennäköisesti merkitystä alkoiden kehitykselle. Pisaraviljely saattaa vaikuttaa liuoksen happipitoisuuteen edullisesti. Laboratoriossa on monta muutakin mahdollista oksidatiiviseen stressiin liittyvää tekijää -liuosten ja öljyjen koostumus, viljelykaapin happipitoisuus, yhdessä viljeltävien munasolujen, siittiöiden ja alkoiden määrät ja kesto sekä monet solujen käsittelyvaiheet. Näiden mittausten perusteella saatiin viitteitä siitä, millaisia eroja liuksissa on ja miten ne voisivat vaikuttaa alkioihin. Tiolien ja hypoksantiinin lähtöpitoisuuksissa on eroja. Yhden aminohapon, kuten metioniin, lisääminen liuokseen vaikuttaa muidenkin aineiden osuuksiin, kuten tässä tutkimuksessa näyttäisi kysteiinipitoisuuksien kanssa olevan. Liuosten happiradikaali- ja tiolipitoisuuksien mittaaminen erilaisissa tilanteissa voisi tarjota lisätietoa siitä, milloin tarvitaan enemmän ja milloin vähemmän tiettyjä aminohappoja, tioleja tai antioksidanteja. Toinen syy voisi olla löytää näiden aineiden yhteys alkoiden kehityskykyyn. Happiradikaalien mittaaminen jokaisen alkion kohdalla erikseen tuskin on kannattavaa. Toisaalta alkoiden arviointi pelkän morfologian perusteella ei näytä olevan riittävää. Siksi joitakin solun ulkopuolisia alkion laadun ja kehityskyvyn ilmaisijoita voidaan tulevaisuudessa käyttää.

Pisaraviljelyn vaikutukset jäivät avoimiksi ja niiden huolellisempi selvittäminen jatkossa olisi hyödyllistä. Pisanan pieni tilavuus todennäköisesti vaikuttaa alkoiden olosuhteisiin viljelyssä verrattuna suureen tilavuuteen keskikuoppamaljalla. Öljy pisanan päällä saattaa myös suojata hapen haitallisilta vaikutuksilta. Luonnollisesti myös happipitoisuudella itsessään on merkitystä viljelyolosuhteissa. Oksidatiivisen stressin välttäminen on alkionkehitykselle elintärkeää, ja sen tutkiminen hedelmöityshoidoissa ja alkioviljelyssä tulee todennäköisesti edelleen lisääntymään.

[Lisäys 12.10.2006]

Tämän tutkimuksen hoitokierroissa pakastettujen, kahden päivän ikäisten, alkoiden siirroista saatiin ensimmäiset tulokset, kun suurin osa pakastetuista alkioista oli siirretty potilaille. Alkaneet raskaudet yhdistettiin aiempiin, saman hoitokierron tuoresiirtojen raskaustuloksiin (taulukko XI).

Nämä kumulatiiviset tulokset ovat mielenkiintoisia erityisesti Universal IVF -liuosryhmien osalta. Raskauksien määrät vastaavat Universal IVF pisaraviljelyn ryhmistä aiemmin saatuja tuoresiirtojen tuloksia. Raskauksia on tässä ryhmässä edelleen huomattavasti muita enemmän (53,3 %). Universal IVF avoviljelyn kohdalla tuorealkionsiirroista saatu poikkeavan pieni raskauksien määrä (11,1 %) on tässä lähempänä keskimääräistä tasoa tai suurempi. Yhteenlasketusti raskauksia on tässä ryhmässä nyt toiseksi eniten.

Taulukko XI. Kumulatiiviset raskaustulokset tuore- ja pakastetun alkion siirroista (12.9.2006).

Alkionsiirrot D2	Universal IVF avo	Universal IVF pisara	ISM1	Vitrolife
Munasolukeräykset	49	43	53	54
Jatkuvat raskaudet / tuore siirto (%)	5 / 45 (11,1)	15 / 40 (37,5)	9 / 47 (19,1)	13 / 52 (25)
Jatkuvat raskaudet / munasolukeräys (%)	20 / 49 (40,8)	23 / 43 (53,5)	15 / 53 (28,3)	21 / 54 (38,8)

## Lähdeluetelo

- Alikani, M., G. Calderon, G. Tomkin, J. Garrisi, M. Kokot & J. Cohen. 2000. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum. Reprod.* 15(12):2634-43.
- Aoki, V.W., A.L. Wilcox, C.M. Peterson, K. Parker-Jones, H.H. Hatasaka, M. Gibson, I. Huang & D.T. Carrell. 2005. Comparison of four media types during 3-day human IVF embryo culture. *Reprod. Biomed. Online.* 10(5):600-6.
- Bahceci, M., H.N. Ciray, L. Karagenc, U. Ulug & F. Bener. 2005. Effect of oxygen concentration during the incubation of embryos of women undergoing ICSI and embryo transfer: a prospective randomized study. *Reprod. Biomed. Online.* 11(4):438-43.
- Balaban, B. & B. Urman. 2005. Comparison of two sequential media for culturing cleavage-stage embryos and blastocysts: embryo characteristics and clinical outcome. *Reprod. Biomed. Online.* 10(4):485-91.
- Bedaiwy, M.A., T. Falcone, M.S. Mohamed, A.A. Aleem, R.K. Sharma, S.E. Worley, J. Thornton & A. Agarwal. 2004. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. *Fertil. Steril.* 82(3):593-600.
- Blake, D., P. Svalander, M. Jin, C. Silversand & L. Hamberger. 2002. Protein supplementation of human IVF culture media. *J. Assist. Reprod. Genet.* 19(3):137-43. Review.
- Boquest, A.C., L.R. Abeydeera, W.H. Wang & B.N. Day. 1999. Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos in vitro. *Theriogenology.* 51(7):1311-9.
- Bos-Mikich, A., A.L. Mattos & A.N. Ferrari. 2001. Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. *Hum. Reprod.* 16(12):2658-61.
- Burton, G.J., J. Hempstock & E. Jauniaux. 2003. Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. *Reprod. Biomed. Online.* 6(1):84-96. Review.
- Check, J.H., J.K. Choe, D. Katsoff, D. Summers-Chase & C. Wilson. 1999. Controlled ovarian hyperstimulation adversely affects implantation following in vitro fertilization-embryo transfer. *J. Assist. Reprod. Genet.* 16(8):416-20.
- Clementini, E., C. Palka, I. Iezzi, L. Stuppia, P. Guanciali-Franchi & G.M. Tiboni. 2005. Prevalence of chromosomal abnormalities in 2078 infertile couples referred for assisted reproductive techniques. *Hum. Reprod.* 20(2):437-42.
- Cooke, S., P. Quinn, L. Kime, C. Ayres, J.P. Tyler & G.L. Driscoll. 2002. Improvement in early human embryo development using new formulation sequential stage-specific culture media. *Fertil. Steril.* 78(6):1254-60.
- Daya, S. & J. Gunby. 1999. Recombinant versus urinary follicle stimulating hormone for ovarian stimulation in assisted reproduction. *Hum. Reprod.* 14(9):2207-15.
- Devreker, F., R.M. Winston & K. Hardy. 1998. Glutamine improves human preimplantation development in vitro. *Fertil. Steril.* 69(2):293-9.
- Devreker, F., M. Van den Bergh, J. Biramane, R.L. Winston, Y. Englert & K. Hardy. 1999. Effects of taurine on human embryo development in vitro. *Hum. Reprod.* 14(9):2350-6.
- Dienhart, M.K., M.J. O'Brien & S.M. Downs. 1997. Uptake and salvage of hypoxanthine mediates developmental arrest in preimplantation mouse embryos. *Biol. Reprod.* 56(1):1-13.

- Doherty, A.S., M.R. Mann, K.D. Tremblay, M.S. Bartolomei & R.M. Schultz. 2000. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol. Reprod.* 62(6):1526-35.
- Downs, S.M. & M.P. Dow. 1991. Hypoxanthine-maintained two-cell block in mouse embryos: dependence on glucose and effect of hypoxanthine phosphoribosyltransferase inhibitors. *Biol. Reprod.* 44(6):1025-39.
- Dumoulin, J.C., C.J. Meijers, M. Bras, E. Coonen, J.P. Geraedts & J.L. Evers. 1999. Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryo culture. *Hum. Reprod.* 14(2):465-9.
- Dumoulin, J.C., E. Coonen, M. Bras, L.C. van Wissen, R. Ignoul-Vanvuchelen, J.M. Bergers-Jansen, J.G. Derhaag, J.P. Geraedts & J.L. Evers. 2000. Comparison of in-vitro development of embryos originating from either conventional in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 15(2):402-9.
- Ebner, T., M. Moser, M. Sommergruber & G. Tews. 2003. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum. Reprod. Update.* 2003 9(3):251-62.
- Edwards, L.J., D.A. Williams & D.K. Gardner. 1998. Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH. *Hum. Reprod.* 13(12):3441-8.
- Erb, K ym. 2004. A multicenter study comparing sibling oocytes cultured in ISM1 versus Universal IVF medium. <http://www.medicult.com/D9DB172B-A7B1-4B5B-90F4-68444D143089>. Haettu 5.5.2006.
- Foong, S.C., J.A. Fleetham, J.A. O'Keane, S.G. Scott, S.C. Tough & C.A. Greene. 2006. A prospective randomized trial of conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in unexplained infertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* 23(3):137-40. Epub 2006 Apr 19.
- Fukui, Y., E.S. Lee & N. Araki. 1996. Effect of medium renewal during culture in two different culture systems on development to blastocysts from in vitro produced early bovine embryos. *J. Anim. Sci.* 74(11):2752-8.
- Gardiner, C.S. & D.J. Reed. 1994. Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. *Biol. Reprod.* 51(6):1307-14.
- Gardiner, C.S., J.J. Salmen, C.J. Brandt & S.K. Stover. 1998. Glutathione is present in reproductive tract secretions and improves development of mouse embryos after chemically induced glutathione depletion. *Biol. Reprod.* 59(2):431-6.
- Gardner, D.K. & M. Lane. 1993. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol. Reprod.* 48(2):377-85.
- Gardner, D.K., M. Lane, I. Calderon & J. Leeton. 1996. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil. Steril.* 65(2):349-353.
- Gardner, D.K. & M. Lane. 1996. Alleviation of the '2-cell block' and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Hum. Reprod.* 11(12):2703-12.
- Gardner, D.K., P. Vella, M. Lane, L. Wagley, T. Schlenker & W.B. Schoolcraft. 1998a. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil. Steril.* 69(1):84-8.
- Gardner, D.K. 1998b. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology.* 1;49(1):83-102. Review.



- Gardner, D.K., H. Rodriegez-Martinez & M. Lane. 1999. Fetal development after transfer is increased by replacing protein with the glycosaminoglycan hyaluronan for mouse embryo culture and transfer. *Hum. Reprod.* 14(10):2575-80.
- Gardner, D.K., M. Lane & W.B. Schoolcraft. 2002. Physiology and culture of the human blastocyst. *J. Reprod. Immunol.* 55(1-2):85-100. Review.
- Gardner, D.K., E. Surrey, D. Minjarez, A. Leitz, J. Stevens & W.B. Schoolcraft. 2004. Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertil. Steril.* 81(3):551-5.
- Grady, L.H., D.J. Nonneman, G.E. Rottinghaus & W.V. Welshons. 1991. pH-dependent cytotoxicity of contaminants of phenol red for MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology.* 129(6):3321-30.
- Griffiths, T.A., A.P. Murdoch & M. Herbert. 2000. Embryonic development in vitro is compromised by the ICSI procedure. *Hum. Reprod.* 15(7):1592-6.
- Guérin, P., S. El Mouatassim & Y. Menezo. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update.* 7(2):175-89. Review.
- Hardarson, T., C. Hanson, A. Sjogren & K. Lundin. 2001. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum. Reprod.* 16(2):313-8.
- Houghton, F.D., J.A. Hawkhead, P.G. Humpherson, J.E. Hogg, A.H. Balen, A.J. Rutherford & H.J. Leese. 2002. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum. Reprod.* 17(4):999-1005.
- Jacob, S. & K.H. Moley. 2005. Gametes and embryo epigenetic reprogramming affect developmental outcome: implication for assisted reproductive technologies. *Pediatr. Res.* 58(3):437-46.
- Kim, I.H., A. Van Langendonck, A. Van Soom, G. Vanroose, A.L. Casi, P.J. Hendriksen & M.M. Bevers. 1999. Effect of exogenous glutathione on the in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology.* 52(3):537-47.
- Kitagawa, Y., K. Suzuki, A. Yoneda & T. Watanabe. 2004. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology.* 1;62(7):1186-97.
- Lambert, H., K. Vu, A. Lopez & J. Chesmore. 2005. The evaluation of two different types of sequential culture media systems for human in vitro fertilization using sister oocytes: interim results. Poster, ESHRE Copenhagen, 2005. *Hum. Reprod.* 20 Suppl. 1: Abstracts Book: i156.
- Lane, M. & D.K. Gardner. 1998. Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Hum. Reprod.* 13(4):991-7.
- Lane, M., K. Hooper & D.K. Gardner. 2001. Effect of essential amino acids on mouse embryo viability and ammonium production. *J. Assist. Reprod. Genet.* 18(9):519-25.
- Lane, M. & D.K. Gardner. 2003. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol. Reprod.* 69(4):1109-17. Epub 2003 May 28.
- Laverge, H., P. De Sutter, J. Van der Elst & M. Dhont. 2001. A prospective, randomized study comparing day 2 and day 3 embryo transfer in human IVF. *Hum. Reprod.* 16(3):476-80.
- Loutradis, D., D. John & A.A. Kiessling. 1987. Hypoxanthine causes a 2-cell block in random-bred mouse embryos. *Biol. Reprod.* 37(2):311-6.

- Ludwig, M. & B. Nitz. 2004. Optimisation of possible success in an IVF program. *Zentralbl. Gynakol.* 126(6):368-72.
- Lundin, K., C. Bergh & T. Hardarson. 2001. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum. Reprod.* 16(12):2652-7.
- Magli, M.C., L. Gianaroli, A. Fiorentino, A.P. Ferraretti, D. Fortini & S. Panzella. 1996. Improved cleavage rate of human embryos cultured in antibiotic-free medium. *Hum. Reprod.* 11(7):1520-4.
- Magli, M.C., L. Gianaroli & A.P. Ferraretti. 2001. Chromosomal abnormalities in embryos. *Mol. Cell Endocrinol.* 22;183 Suppl 1:S29-34.
- Mahadevan, M.M., M.M. Miller & D.M. Moutos. 1997. Absence of glucose decreases human fertilization and sperm movement characteristics in vitro. *Hum. Reprod.* 12(1):119-23.
- de Matos, D.G. & C.C. Furnus. 2000. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology.* 53(3):761-71.
- Mauri, A.L., C.G. Petersen, R.L.R. Baruffi & J.G. Franco, Jr. 2001. A Prospective, Randomized Comparison of Two Commercial Media for ICSI and Embryo Culture. *J. Assist. Reprod. Genet.* 18(7):378-81.
- McKiernan, S.H. & B.D. Bavister. 1990. Environmental variables influencing in vitro development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.* 43(3):404-13.
- Mehta, R.H. 2001. Growth of human preimplantation embryos in vitro. *Reprod. Biomed. Online.* 2(2):113-119.
- Munne, S., M. Alikani, G. Tomkin, J. Grifo & J. Cohen. 1995. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil. Steril.* 64(2):382-91.
- Munne, S. & J. Cohen. 1998. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum. Reprod. Update.* 4(6):842-55. Review.
- O'Neill, C. 1998. Autocrine mediators are required to act on the embryo by the 2-cell stage to promote normal development and survival of mouse preimplantation embryos in vitro. *Biol. Reprod.* 58(5):1303-9.
- Niemitz, E.L. & A.P. Feinberg. 2004. Epigenetics and assisted reproductive technology: a call for investigation. *Am. J. Hum. Genet.* 74(4):599-609.
- Olson, S.E. & G.E. Seidel Jr. 2000. Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. *Biol. Reprod.* 62(2):248-52.
- Payne, D., C. Takeshita, Y. Wakatsuki, K. Iwata, Y. Kato, Y. Ueno, S. Flaherty & Y. Mio. 2005. Fragmentation and cytokinesis in human embryos. Oral presentation, ESHRE Copenhagen, 2005. *Hum. Reprod.* 20 Suppl. 1: Abstracts Book: i13.
- Petersen, A., A.L. Mikkelsen & S. Lindenberg. 2005a. The impact of oxygen tension on developmental competence of post-thaw human embryos. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 84(12):1181-4.
- Petersen, C.G., A.L. Mauri, F.C. Massaro, J.B.A. Oliveira, R.L.R. Baruffi & J.G. Franco Jr. 2005b. Human ICSI embryo: development and implantation in open and microdrop culture systems. Poster, ESHRE Copenhagen, 2005. *Hum. Reprod.* 20 Suppl. 1: Abstracts Book: i158-9.
- Racowsky, C., B. Orasanu, M.J. Hinrichsen, E.S. Ginsburg. 2005. Embryo quality based on ovulation induction: defining the differences. *Reprod. Biomed. Online.* 11(1):22-5.

- Rijnders, P.M. & C.A. Jansen. 1999. Influence of group culture and culture volume on the formation of human blastocysts: a prospective randomized study. *Hum. Reprod.* 14(9):2333-7.
- Sakkas, D., F. Urner, Y. Menezo & G. Leppens. 1993. Effects of glucose and fructose on fertilization, cleavage, and viability of mouse embryos in vitro. *Biol. Reprod.* 49(6):1288-92.
- Sakkas, D., Y. Shoukir, D. Chardonnens, P.G. Bianchi & A. Campana. 1998. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum. Reprod.* 13(1):182-7.
- Salha, O., D. Nugent, T. Dada, S. Kaufmann, S. Levett, L. Jenner, S. Lui & V. Sharma. 1998. The relationship between follicular fluid aspirate volume and oocyte maturity in in-vitro fertilization cycles. *Hum. Reprod.* 13(7):1901-6.
- Salumets, A., C. Hyden-Granskog, S. Makinen, A.M. Suikkari, A. Tiitinen & T. Tuuri. 2003a. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum. Reprod.* 18(4):821-5.
- Salumets, A., T. Tuuri, S. Mäkinen, S. Vilksa, L. Husu, R. Tainio & A-M. Suikkari. 2003b. Effect of developmental stage of embryo at freezing on pregnancy outcome of frozen-thawed embryo transfer. *Hum. Reprod.* 18(9):1890-5.
- Shoukir, Y., A. Campana, T. Farley & D. Sakkas. 1997. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum. Reprod.* 12(7):1531-6.
- de Silva, M. 1998. Culturing human embryos with and without glucose. *Fertil. Steril.* 69(5):970-1.
- Spyropoulou, I., C. Karamalegos & V.N. Bolton. 1999. A prospective randomized study comparing the outcome of in-vitro fertilization and embryo transfer following culture of human embryos individually or in groups before embryo transfer on day 2. *Hum. Reprod.* 14(1):76-9.
- Staessen, C., C. Janssenswillen, E. De Clerck & A. Van Steirteghem. 1998. Controlled comparison of commercial media for human in-vitro fertilization: Menezo B2 medium versus Medi-Cult universal and BMI medium. *Hum. Reprod.* 13(9):2548-54.
- Staessen, C., M. Camus, K. Clasen, A. De Vos & A. Van Steirteghem. 1999. Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in sibling oocytes from couples with tubal infertility and normozoospermic semen. *Hum. Reprod.* 14(10):2474-9.
- STAKES. 2006. Hedelmöityshoitotilastot 2004 ja ennakkotiedot 2005. <http://www.stakes.fi/FI/Tilastot/Aiheittain/Lisaantyminen/hoidot/index.htm> Haettu 5.6.2006.
- Summers, M.C. & J.D. Biggers. 2003. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Hum. Reprod. Update.* 9(6):557-82. Review.
- Summers, M.C., L.K. McGinnis, J.A. Lawitts & J.D. Biggers. 2005. Mouse embryo development following IVF in media containing either L-glutamine or glycyl-L-glutamine. *Hum. Reprod.* 20(5):1364-71.
- Summers-Chase, D., J.H. Check, K. Swenson, W. Yuan, D. Brittingham & H. Barci. 2004. A comparison of in vitro fertilization outcome by culture media used for developing cleavage-stage embryos. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 31(3):179-82.
- Tay, J.I., A.J. Rutherford, S.R. Killick, S.D. Maguiness, R.J. Partridge & H.J. Leese. 1997. Human tubal fluid: production, nutrient composition and response to adrenergic agents. *Hum. Reprod.* 12(11):2451-6.

- Thompson, J.G., C. McNaughton, B. Gasparri, L.T. McGowan & H.R. Tervit. 2000. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 118(1):47-55.
- Trimarchi, J.R., L. Liu, D.M. Porterfield, P.J. Smith & D.L. Keefe. 2000. Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol. Reprod.* 62(6):1866-74.
- Ubaldi, F., L. Rienzi, E. Baroni, S. Ferrero, M. Iacobelli, M.G. Minasi, F. Sapienza, F. Martinez, R. Anniballo, L. Cobellis, J. Tesarik & E. Greco. 2004. Cumulative pregnancy rates after transfer of fresh and thawed embryos. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 115 Suppl 1:S106-9.
- Urner, F. & D. Sakkas. 1996. Glucose participates in sperm-oocyte fusion in the mouse. *Biol. Reprod.* (4):917-22.
- Van Blerkom, J., P. Davis & S. Alexander. 2001. A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriate human embryos. *Hum. Reprod.* 16(4):719-29.
- Van Langendonck, A., D. Demylle, C. Wyns, M. Nisolle & J. Donnez. 2001. Comparison of G1.2/G2.2 and Sydney IVF cleavage/blastocyst sequential media for the culture of human embryos: a prospective, randomized, comparative study. *Fertil. Steril.* 76(5):1023-31.
- Vilks, S., A. Tiitinen, C. Hyden-Granskog & O. Hovatta. 1999. Elective transfer of one embryo results in an acceptable pregnancy rate and eliminates the risk of multiple birth. *Hum. Reprod.* 14(9):2392-5.
- Wang, W.H., L. Meng, R.J. Hackett, R. Odenbourg & D.L. Keefe. 2001. Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy. *Hum. Reprod.* 16(11):2374-8.
- Wang, X., T. Falcone, M. Attaran, J.M. Goldberg, A. Agarwal & R.K. Sharma. 2002. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertil. Steril.* 78(6):1272-7.
- Wharf, E., A. Dimitrakopoulos, Y. Khalaf & S. Pickering. 2004. Early embryo development is an indicator of implantation potential. *Reprod. Biomed. Online.* 8(2):212-8.
- Williams, A.C. & W.C. Ford. 2001. The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. *J. Androl.* 22(4):680-95.
- Wittmaack, F.M., D.O. Kreger, L. Blasco, R.W. Tureck, L. Mastroianni Jr & B.A. Lessey. 1994. Effect of follicular size on oocyte retrieval, fertilization, cleavage, and embryo quality in in vitro fertilization cycles: a 6-year data collection. *Fertil. Steril.* 62(6):1205-10.
- Yoshida, M., K. Ishigaki, T. Nagai, M. Chikyu & V.G. Pursel. 1993. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol. Reprod.* 49(1):89-94.
- Ziebe, S., K. Petersen, S. Lindenberg, A.-G. Andersen, A. Gabrielsen & A. Nyboe Andersen. 1997. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 12(7):1545-1549.
- Zollner, K.-P., U. Zollner, M. Schneider, J. Dietl & T. Steck. 2004. Comparison of two media for sequential culture after IVF and ICSI shows no differences in pregnancy rates: a randomized trial. *Med. Sci. Monit.* 10(1):CR1-7.