Samband mellan nukleära avvikelser i tvåcellsstadiet hos embryon efter assisterad befruktning och chans till graviditet och levande fött barn

Association between nuclear errors in the two-cell stage of embryos after assisted fertilization and chances of pregnancy and live birth

Författare: Helbeen Sadullah

Vårtermin 2023

Examensarbete: Grundnivå, 15 högskolepoäng
Huvudområde: Biomedicinsk laboratorievetenskap

Biomedicinska analytikerprogrammet, BMLV, Examensarbete, BL115G, inriktning laboratoriemedicin

Institutionen för hälsovetenskaper, Örebro universitet.

Handledare: Emma Adolfsson, Leg Biomedicinsk analytiker/senior embryolog på Reproduktionsmedicinskt centrum vid Universitetssjukhuset i Örebro

Examinator: Gabriella Lillsunde-Larsson, lektor, Örebro universitet

Sammanfattning

Bakgrund

Assisterad befruktning är en vanlig behandling för infertilitet, vilket innebär oförmågan att bli gravid. Vid assisterad befruktning övervakas embryoutvecklingen med hjälp av Time Lapse Imaging-teknologi i en EmbryoScope och implantationsförmågan bedöms. Tidigare forskning har identifierat nukleära avvikelser (NE) i tidig embryoutveckling som kan påverka graviditetsfrekvensen (Pregnancy Rate, PR) och frekvensen av levande födda barn (live birth rate, LBR). Idag beräknas NE till fyra fenotyper (NEP): binukleation, mikronukleation, multinukleation samt splittrad nukleation.

Syfte

Syftet med denna retrospektiva registerstudie var att undersöka sambandet mellan NE under tidig embryoutveckling och PR, LBR samt missfall för att förbättra embryoselektionen vid Reproduktionsmedicinskt centrum (RMC) på Örebro universitetssjukhus (USÖ).

Resultat

Resultatet visade att 37,5% av de återförda blastocysterna i studien hade NE, och att PR och LBR påverkades av vilken NEP embryot hade. Embryon med binukleäritet hade högre PR och LBR än embryon med övriga kärnstatusar. KIDScore D5 visade sig vara ett bra selektionsverktyg för blastocyster återförda dag 5, men närvaron/frånvaron av NE påverkade kopplingen mellan KIDScore D5 och graviditet/barn på ett oväntat sätt, beroende på NEP.

Slutsats

Embryoselektionen vid RMC på USÖ kan förbättras genom att ta hänsyn till kärnstatusen i tidig embryoutveckling, men en större studiepopulation behövs för att bekräfta korrelationen mellan alla variabler.

Nyckelord: Assisterad befruktning, nukleära avvikelser, multinukleäritet, embryobedömning.

Abstract

Background

Assisted reproduction is a common treatment for infertility, which is the inability to become pregnant. In assisted reproduction, the development of embryos is monitored using Time Lapse Imaging technology in an EmbryoScope, and the implantation potential is assessed. Previous research has identified nuclear errors (NE) in early embryonic development that can affect pregnancy rates (PR) and live birth rates (LBR). NE is currently divided into four phenotypes (NEP): binucleation, micronucleation, multinucleation, and fragmented nucleation.

Objective

The purpose of this retrospective registry study was to investigate the correlation between NE in early embryonic development and PR, LBR, and miscarriage to improve embryo selection at the Reproductive Medicine Center (RMC) at Örebro University Hospital (USÖ).

Results

The results showed that 37.5% of the returned blastocysts in the study had NE, and that PR and LBR were affected by the NEP of the embryo. Embryos with binucleation had higher PR and LBR than embryos with other nuclear statuses. KIDScore D5 was found to be a good selection tool for blastocysts returned on day 5, but the presence/absence of NE affected the correlation between KIDScore D5 and pregnancy/childbirth in an unexpected way, depending on the NEP.

Conclusion

Embryo selection at RMC at USÖ can be improved by considering the nuclear status in early embryonic development, but a larger study population is needed to confirm the correlation between all variables.

Keywords: Assisted fertilization, nuclear errors, multinuclearity, embryo assessment.

Innehållsförteckning

Förkortningslista **1**

Introduktion **2**

Det kvinnliga reproduktionsorganet och dess biologiska processer 2

Produktion av kvinnliga könscellerna *2*

Fysiologin av menstruationscykeln hos kvinnan *2*

Interaktionen mellan kvinnliga och manliga gameter samt embryonal utveckling 3

Infertilitet och behandling med assisterad befruktning 4

Infertilitet: Orsaker och faktorer som påverkar manlig och kvinnlig infertilitet *4*

Assisterad befruktning: Metoder och tekniker för att behandla infertilitet *4*

EmbryoScope: En modern teknik för bedömning av embryokvalitet genom Time-lapse imaging 5

Known Implantation Data Scoring Day 5 Algorithm 7

Blastomerer med nukleära avvikelser i embryon vid tvåcellsstadiet 8

Syfte och frågeställningar 10

Material och metod **11**

Studiedesign 11

Material 11

Assisterad befruktning 12

Embryobedömning och embryoselektion med Time-lapse imaging 13

Bedömning av kärnstatus 14

Dataanalys och statistik 14

Etiska överväganden 15

Resultat **16**

Förekomst av NE i materialet vid RMC 16

Samband mellan graviditet, levande fött barn, missfall och NEP 17

Reversibilitet hos embryon med NE 19

Samband mellan KIDScore D5 och NEP 20

Diskussion 23

Incidens av NE i materialet vid RMC 23

Korrelationen mellan graviditet, levande fött barn samt missfall och NEP 24

Reversibilitetsfrekvens bland embryon med NE i materialet vid RMC 25

Samband mellan NEP och KIDScore D5 respektive reversibilitet 26

Slutsats 27

Slutord 28

Referenser 29

***Bilaga 1* 32**

Förkortningslista

D5 – återföringsdag fem

D6 – återföringsdag sex

FSH – follikelstimulerande hormon

GnRH – gonadotropin-releasing hormone

hCG – human chorionic gonadotropin

hpi – hours post insemination

ICM – inre cellmassan

ICSI – intracytoplasmatisk spermieinjektion

IVF – *in vitro* fertilisering

KIDScore D5 – Known Implantation Data Scoring Day Five Algorithm

LBR – live birth rate

LH – luteiniserande hormon

MNB – multinucleated blastomere

NE – nuclear error

NE^{bi} – NE med binukleäritet

NE^{mikro} – NE med mikronukleäritet

NE^{multi} – NE med multinukleäritet

NE^{split} – NE med splittrade cellkärnor

NE^{mixed} – NE med mixed errors

NEP – nuclear error phenotype

PR – pregnancy rate

RMC – Reproduktionsmedicinsk centrum

t2 – tidpunkt för tvåcellsstadiet

t3 – tidpunkt för trecellsstadiet

t4 – tidpunkt för fyrcellsstadiet

t5 – tidpunkt för femcellsstadiet

tB – time of blastocyst formation

TE – trofektodermet

TLI – Time-lapse imaging

USÖ – Universitetssjukhuset Örebro

Introduktion

Det kvinnliga reproduktionsorganet och dess biologiska processer

Produktion av kvinnliga könscellerna

Kvinnans reproduktionssystem är ansvarigt för produktionen och mognaden av de kvinnliga könscellerna, så kallade gameter, samt produktionen av hormoner så som östradiol, progesteron, gonadotropinfrisättande hormon (GnRH[1]), follikelstimulerande hormon (FSH), luteniserande hormon (LH) och humant koriongonadotropin (hCG[2]). Dessutom ansvarar systemet för att tillhandahålla näring till de befruktade oocyterna (embryon) under utvecklingen till foster och förbereder kroppen inför förlossning (1).

Produktionen av kvinnliga gameter sker genom en process som kallas för oogenes, där primitiva gameter (oogonier) i kvinnans äggstockar, även känt som ovarier, prolifererar genom mitos. Celldelningen inleds under tidig fosterutveckling, och upphör helt när det har bildats cirka sju miljoner gameter (1). Majoriteten av dessa genomgår dock apoptos, medan en liten del kvarstår och genomgår den första meiotiska celldelningen, meios I (1). De utvecklas till primära oocyter som omges av ett tunt lager av skivepitelceller, vilket bildar en promordial follikel, och hamnar i en meiotisk arrest i profas I (1,2).

Fysiologin av menstruationscykeln hos kvinnan

Cirka 400 av de primära oocyterna utvecklas vidare genom oogenesen vid pubertetens början, vilket markerar början av kvinnans fertila period. Detta sker vanligtvis när den första menstruationen, menarche, inträffar vid ungefär 12-13 års ålder (1,2). Den fertila perioden pågår tills menstruationen uteblir i tolv månader vid ungefär 45-50 års ålder, menopaus. Menstruationscykeln varar i cirka 28 dagar och är uppdelad i två faser, follikelfasen och lutealfasen (1).

Under follikelfasen frisätts FSH som stimulerar interaktionen mellan oocyterna och folliklarnas skivepitelceller. Denna interaktion bidrar till att oocyterna ökar i storlek och lagret av folliklarnas skivepitelceller förtjockas, vilket resulterar i primära folliklar. Interaktionen bidrar även till produktion av ett lager glykoproteiner på oocyternas yta, kallat zona pellucida, och till utvecklingen av primära folliklar till sekundära folliklar med flera lager av skivepitelceller (2).

[1] GnRH står för det engelska ordet gonadotropin-releasing hormone
[2] hCG står för det engelska ordet human chorionic gonadotropin

En av de sekundära folliklarna fortsätter att utvecklas till en dominant follikel, medan resten genomgår atresi (1). Det är inte klarlagt vilka faktorer som avgör vilken follikel som får utvecklas vidare och vilka som degenererar genom atresi (2). Under follikelfasen stimuleras folliklarna att utsöndra östradiol. Östrogen är det hormon som bidrar till förtjockning av livmoderslemhinnan, endometriet, och förbereder den för mottagandet av en befruktad oocyt (1). Utsöndringen av östrogen ger även negativ återkoppling för utsöndringen av FSH, vilket resulterar i positiv återkoppling på utsöndringen av LH som initierar lutealfasen (1,2).

Under fasövergången bildas en hålighet (antrum) mellan lagren av folliklarnas skivepitelceller, nu kallade cumulusceller, och den dominanta follikeln utvecklas till en mogen follikel, kallad en Graafsk follikel (2). Utsöndringen av LH stimulerar ägglossningen, vilket frigör oocyten från follikeln. Resterna av follikeln bildar corpus luteum (gulkropp), medan oocyten vandrar till äggledaren omgiven av ett tunt skikt med cumulusceller (1).

Interaktionen mellan kvinnliga och manliga gameter samt embryonal utveckling

Vid kontakt med sekret från det kvinnliga könsorganet genomgår manliga gameter (spermier) en process som kallas för kapacitering (2). Denna process påverkar spermiernas struktur, sammansättning och aktivitet och är nödvändig för att spermierna ska kunna tränga in i oocyten genom extracellulära matriser, inklusive cumuluscellerna och zona pellucida (1,2). Förändringarna som sker under denna process är också avgörande för att uppnå zygotstadiet, där gameternas cellkärnor (pronuklei) smälter samman till en enda cell, en zygot, och för att initiera celldelningen av blastomerer, cellerna i embryot (1). Embryot växer genom kontinuerlig celldelning av blastomererna och bildar en blastocyst som består av tre delar: inre cellmassan (ICM), trofektodermet (TE) och expansionen, även känd som blastocoelet (1,2). ICM utvecklas till fostret, medan TE bildar placentan. Expansionen är ett vätskefyllt utrymme som gradvis expanderar och bidrar till hatching, vilket innebär att blastocysten bryter sig loss från zona pellucida och ökar i storlek. Detta gör att blastocysten kan fästa i endometriet och möjliggör för embryot att fortsätta sin utveckling (1).

Efter befruktning tar det cirka två veckor för blastocysten att implanteras i endometriet. Därifrån frisätts hormonet hCG som behövs för att upprätthålla corpus luteum samt dess progesteronproduktion, vilket bidrar till att bevara endometriet tills placentan utvecklas och tar över dess funktion. Om oocyten inte blir befruktad bryts corpus luteum ned,

hormonproduktionen minskar och det förtjockade endometriet stöts ut från livmodern som en menstruationsblödning (1).

Infertilitet och behandling med assisterad befruktning

Infertilitet: Orsaker och faktorer som påverkar manlig och kvinnlig infertilitet

Infertilitet är en medicinsk term som innebär oförmågan att uppnå en graviditet och är ett tillstånd som drabbar cirka 190 miljoner människor runtom i världen (3). Infertilitet förekommer i olika former, däribland primär infertilitet där graviditet inte har uppstått tidigare, sekundär infertilitet där graviditeter inte har resulterat i levande födslar, och subfertilitet där fertiliteten är nedsatt men inte helt upphävd (1). Infertilitet kan ha både kvinnliga och manliga faktorer som orsak, som kan bero på en kombination av genetiska-, livsstils- och miljömässiga faktorer (3). Livsstilsrelaterade faktorer som rökning, överdriven alkoholkonsumtion och övervikt kan bidra till infertilitet. I miljörelaterade faktorer inkluderas exponering för föroreningar och kemiska toxiner, inklusive kemoterapi, som kan vara skadliga för könscellerna och minska produktionen och kvaliteten av både manliga och kvinnliga gameter (4).

Hos kvinnan orsakas infertiliteten av bland annat avvikelser i ovarierna, såsom prematur ovariesvikt eller polycystiskt ovariesyndrom. Även avvikelser i det endokrina systemet som resulterar i obalans hos reproduktionshormonerna, genetiska orsaker som exempelvis ger upphov till endometrios, med mera kan vara en bakomliggande orsak (3). Hos män består orsakerna till infertilitet av olika tillstånd som störningar i sädesuttömningen, spermieproduktionen och som resulterar i onormal morfologi och/eller motilitet hos spermierna (3). Även idiopatisk infertilitet förekommer hos män, där spermierna i semen ser normala ut men är oförmögna att befrukta oocyter, samt anti-spermieantikroppar (1,5). Anti-spermieantikroppar bildas när blod-testis barriären bryts ned vid exempelvis våld mot testikeln. Vid kontakt med blodet producerar immunförsvarscellerna antikroppar mot spermierna och gör att semen koagulerar (1).

Assisterad befruktning: Metoder och tekniker för att behandla infertilitet

Assisterad befruktning är en klinisk metod som används för att behandla infertilitet hos personer som inte kan uppnå graviditet på egen hand på naturlig väg. Assisterad befruktning inleds med hormonstimulering av kvinnans ovarier för att stimulera ovarierna till multipel follikeltillväxt, vilket kan öka antalet tillgängliga oocyter för befruktning. Stimuleringen kan utföras enligt två alternativa protokoll, det långa eller det korta protokollet. Det långa protokollet inleds med en

suprimeringsfas där en GnRH-agonist administreras. GnRH är det hormon som stimulerar den naturliga hormonproduktionen för att bättre kontrollera starten av follikeltillväxten. Det korta protokollet inleds med direkt follikelstimulering utan nedreglering av den naturliga hormonproduktionen. När folliklarna har uppnått en adekvat storlek induceras ägglossning genom administration av hCG, följt av transvaginal punktion av ovarierna med hjälp av en ultraljudsstav utrustad med en aspirationsnål för att aspirera follikelvätskan och samla in oocyterna (1).

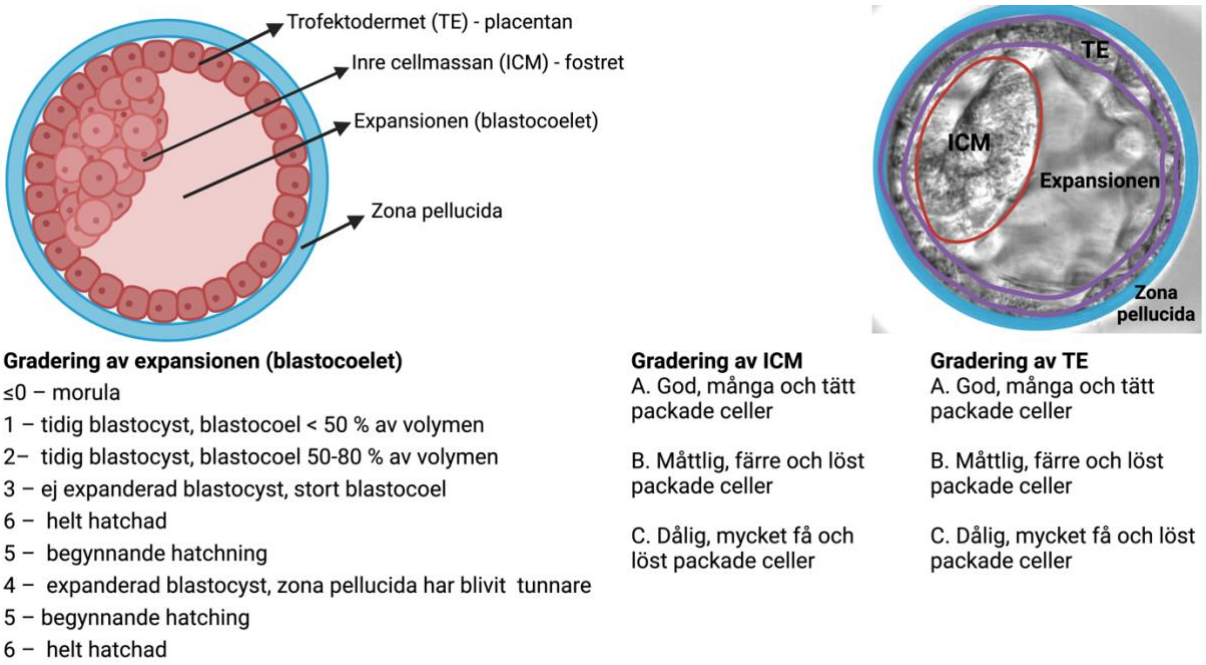
Assisterad befruktning innefattar vanligtvis två huvudsakliga metodprinciper: *in vitro* fertilisering (IVF) och intracytoplasmatisk spermieinjektion (ICSI). Vid IVF tillsätts spermier i en petriskål med en eller flera oocyter, vilken inkuberas över natten. Med egen kraft tränger sig spermier genom granulosacellerna som omger oocyten och binder in, samt penetrerar genom zona pellucida där gameter pronuklei smälter samman. Granulosacellerna runt zona pellucida avlägsnas av en embryolog och placeras i en time-lapse inkubator för att underlätta mikroskopisk övervakning av embryoutvecklingen. Vid ICSI används en mikroinjektionspipett för att injicera en enda spermie genom zona pellucida och in i oocytens cytoplasma. Granulosacellerna runt oocyten avlägsnas i förväg för att underlätta orientering, manipulation och insemination under mikroskopisk uppsikt (1).

Vid embryoodling är det av största vikt att använda en lämplig odlingsmiljö som efterliknar den fysiologiska miljön i kvinnans livmoder så mycket som möjligt, vad gäller temperatur, pH och näringsämnen. Embryot genomgår en komplex process och är mycket känsligt för avvikelser i miljöfaktorer vilket kan påverka embryots hälsa och utveckling och därmed försämra prognosen vid assisterad befruktning (1).

EmbryoScope: En modern teknik för bedömning av embryokvalitet genom Time-lapse imaging

Vid assisterad befruktning är målet att uppnå graviditet genom att överföra endast ett embryo åt gången (singel transfer). Anledningen till detta är att förebygga komplikationer som kan uppstå vid tvillinggraviditeter (6). En embryolog ansvarar för att bedöma och selektera fram högkvalitativa embryon för återföring och kryopreservation, samt sortera bort lågkvalitativa embryon. Detta optimerar chanserna för att uppnå lyckad befruktning vid behandling av infertila patienter, samt besparar patienterna psykisk och fysisk påfrestning som följd av misslyckade behandlingar (6,7). För att bedöma huruvida embryon är av tillräckligt bra kvalitet

för att återföras till patienten är det essentiellt att monitorera dess morfologi under utvecklingen (8). Traditionellt studeras embryon genom mikroskopering, där de bedöms baserat på morfologiska kriterier av blastocyst-utvecklingen med hjälp av Gardner´s Schoolcraft kriterium (se Figur 1). Dessa kriterier baseras på expansionen och celltätheten av ICM samt TE (9). Expansionen graderas på en skala från ett till sex, medan både ICM och TE graderas som A-C (2).



Figur 1. Figuren illustrerar klassificering av expansionen (blastocoel), inre cellmassan (ICM) och trofektodermet (TE) enligt Gardner´s Schoolcraft kriterium (10).

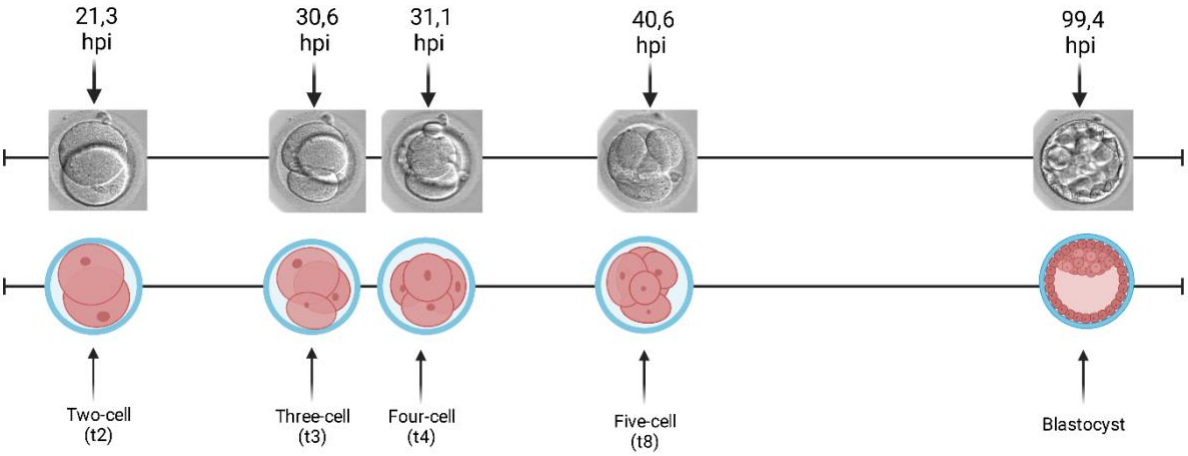
Embryoscope är en modern inkubator med en inbyggd Time-lapse imaging (TLI[3]) kamera som möjliggör nästintill kontinuerlig övervakning, analys och dokumentation av hela embryotutvecklingen. Fotograferingen sker med jämna intervall mellan 5-20 minuter i upp till sex dagar och täcker tre till elva olika fokalplan utan att det påverkar embryoutvecklingen eller embryons implantationsförmåga (11,12). Vid slutet av odlingsperioden genererar kameran en videosekvens som täcker hela embryoutvecklingen. Morfologiska förändringar och morfokinetiska händelser (kombination av celldelningshastighet och celldelningsmönster) under embryoutvecklingen annoteras i realtid av embryologen, vilket gör det möjligt att studera embryot utan att ta ut skålen ur en trygg miljö när som helst under dagen (6,11). TLI minskar

[3] TLI står för det engelska ordet Time-lapse imaging

påverkan på odlingsmiljön, och bidrar därmed till en säkrare, mer tillförlitlig och flexibel bedömning utan att utsätta embryot för metabol stress (11).

Known Implantation Data Scoring Day 5 Algorithm

Known Implantation Data Scoring Day 5 Algorithm (KIDScore D5[4]) är ett inbyggt systemverktyg i mjukvaran för EmbryoScope och används för att bedöma implantationsförmågan hos ett embryo. Under observationer av morfokinetiska händelser matas informationen in av en embryolog i systemet där embryoutvecklingen sedan jämförs med en algoritm som är baserad på dokumenterade implantationsdata med tidpunkter i timmar efter implantation (hpi[5]). Tidsangivelserna som tas med i beräkningen avser tidpunkterna då blastomererna i embryot uppnår tvåcellsstadiet (t2), trecellsstadiet (t3), fyrcellsstadiet (t4), femcellsstadiet (t5) samt initiering av blastocystutveckling (tB[6]) (se Figur 2). Algoritmen tar även hänsyn till embryologens gradering av embryot baserat på Gardner´s Schoolcraft kriterium för expansionen, ICM och TE. Verktyget underlättar embryobedömningen och selektionen för återföring och/eller kryopreservation. Detta åstadkommer verktyget genom att poängsätta embryot med ett värde mellan 1,0–9,9, vilket möjliggör tolkning av sambandet mellan egenskaper under embryoutvecklingen och en lyckad graviditet (6).

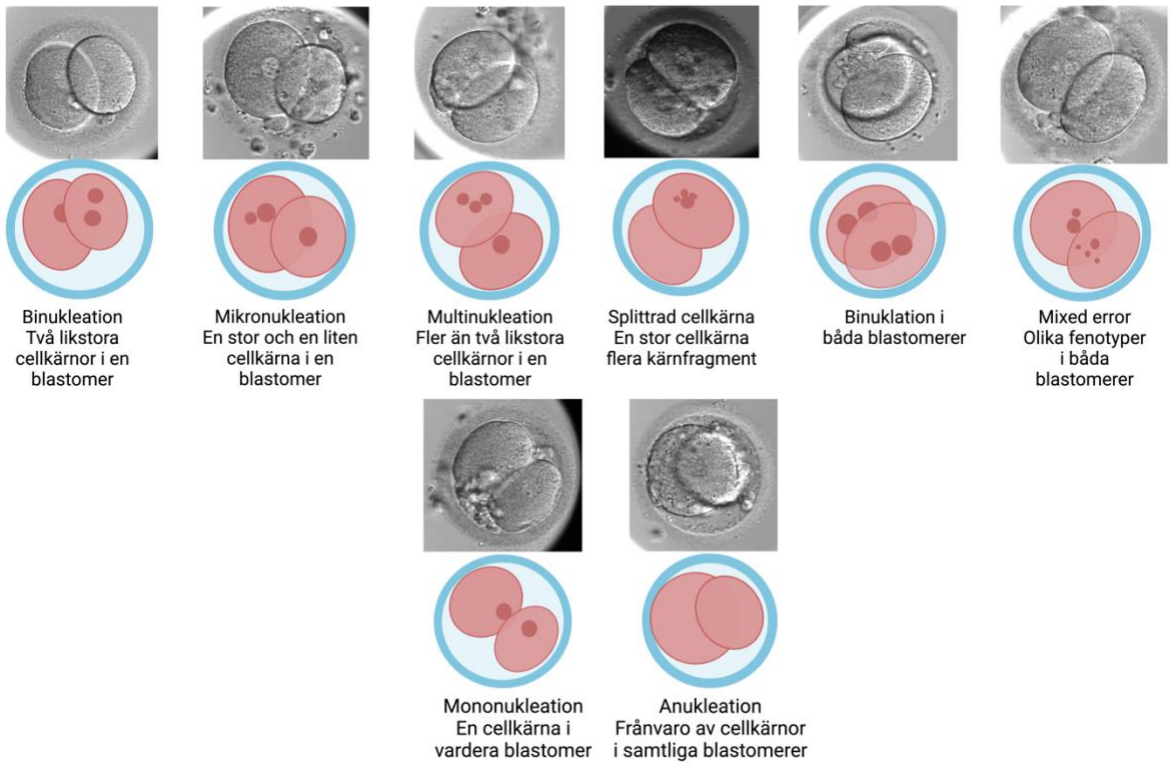


Figur 2. Figuren illustrerar tidslinjen för embryoutvecklingen med tidpunkterna för de parametrar som tas med i räkningen vid Known Implantation Data Scoring Day 5 (KIDScore D5) Algorithm System version 3 från tvåcellsstadiet (t2), till och med bildandet av blastocysten (tB).

[4] KIDScore D5 står för det engelska ordet Known Implantation Data Scoring Day Five Algorithm
[5] hpi - hours post insemination
[6] tB står för det engelska ordet timing of blastocyst formation

Blastomerer med nukleära avvikelser i embryon vid tvåcellsstadiet

Blastomerer med normal kärnstatus kallas för mononukleära blastomerer, där en cellkärna observeras i varje blastomer, eller anukleära blastomerer, där ingen cellkärna identifieras (7,13). I vissa fall kan embryon uppvisa blastomerer som innehåller fler än en cellkärna, vilket benämns som multinukleära blastomerer (MNB[7]) eller som embryon med nukleära avvikelser (NE[8]). Dessa avvikelser förekommer framför allt hos blastomerer i de tidiga stadierna under embryovecklingen (7), med en incidens på 17-69% (13). Idag beräknas NE till fyra olika fenotyper (NEP[9]) med två olika uppsättningar vardera beroende på om NE uttrycks i en eller båda blastomerer vid tvåcellsstadiet. Fenotyperna kategoriseras som binukleation (två likstora cellkärnor i samma blastomer), mikronukleation (två olikstora cellkärnor i samma blastomer), samt multinukleation (> två likstora cellkärnor i samma blastomer) och splittrad nukleation med fragmenterad cellkärna (se Figur 3) (7).



Figur 3. Figuren illustrerar kärnstatusen hos en eller båda blastomerer i embryon vid tvåcellsstadiet, samt exempel på hur det kan se ut vid samma typ av nukleär avvikelse i båda blastomerer. Även mixed error, mononukleärt och anukleärt tillstånd vid tvåcellsstadiet presenteras i figuren (13).

[7] MNB står för det engelska ordet multinucleated blastomere
[8] NE står för det engelska order nuclear error
[9] NEP står för det engelska nuclear error phenotype

Mekanismen som ligger bakom detta fenomen är inte helt förstådd, men det finns flera teorier kring dess uppkomst (15). Bland dessa teorier inkluderas felaktig kromosommigration under anafas i den första mitotiska celldelningen (16,17), negativa temperaturförändringar under metafas II (18), störningar i cellcykeln vid embryonala celldelningen som resulterar i flera cellkärnor i en blastomer, med mera (16). Djur- och människostudier har visat att vid temperaturförändringar under metafas II depolymeriseras den meiotiska spindeln, så att vid repolymerisering kan strukturen och sammansättning av kromosomerna ge upphov till embryon med kromosomavvikelser (16,19). De kromosomala avvikelserna, särskilt i antalet kromosomer (aneuoploidi) (7,15) med högst representation av mosaicism (fler än två kromosomuppsättningar) (7), kan resultera i embryon med MNB som påverkar embryoutvecklingen och därmed embryons implantationsförmåga (16,20). Vid störningar i cellcykeln under den embryonala celldelningen misslyckas blastomeren med att dela sig korrekt, och i rätt takt, vilket kan resultera i embryon med MNB som påverkar embryoutvecklingen och därmed embryots implantationsförmåga (15,20).

Tidigare forskning har visat att embryon med NE ofta förknippas med oregelbundna celldelningar och låg implantationsförmåga (7,21). I Norge utfördes en retrospektiv registerstudie där utfallet av totalt 2769 återförda dag 2 embryon, embryon vid fyrcellsstadiet, till kvinnliga patienter genom assisterad befruktning analyserades. I studien uttryckte 23,8 % av embryon vid tvåcellsstadiet blastomerer med NE (7). Tidigare forskning har också visat att embryon med NE vid tvåcellsstadiet kan självkorrigera till fyrcellsstadiet ((7,22) och fortsätta utvecklas till fina blastocyster (17). Trots detta visade den norska studien att embryon med NE vid fyrscellsstadiet hade en korrelation till lägre graviditetsfrekvens (PR) och frekvens av levande födda barn (LBR) (7). Detta har lett till att embryon med NE används som exkluderingskriterium för att minska risken för misslyckade behandlingar, men har istället lett till minskad tillgång till potentiellt implantationsdugliga embryon och påverkar chanserna till graviditet och födelse av levande födda barn (23). Därför är det av stort intresse att studera utfallen av behandling med embryon som uttrycker NE vid tvåcellsstadiet och olika NEP (7,17) för att undersöka eventuella mönster mellan olika NEP och utfallen av behandlingar med assisterad befruktning, samt avgöra om det är nödvändigt att använda NE som exkluderingsfaktor. Sådana studier kan också bidra till möjlig rangordning av embryon med NEP vid återföring baserat på eventuella signifikanta skillnader i utfall mellan olika NEP (7,17,22,23).

Syfte och frågeställningar

Syftet med arbetet är att undersöka incidensen av NE och NEP hos återförda embryon, med det yttersta syftet att förbättra embryoselektionen och minska behandlingstiden för graviditet hos patienter vid Reproduktionsmedicinskt centrum (RMC) på Universitetssjukhuset i Örebro (USÖ). Korrelationen mellan NE och utfallsvariablerna PR, LBR och missfall analyseras samt eventuell koppling till KIDScore D5 studeras också.

För att uppnå projektets syfte avses följande frågeställningar besvaras; Vad är frekvensen av totalt NE respektive NEP i materialet vid RMC på USÖ, och vilka NEP har en tendens att självkorrigera från tvåcellsstadiet till fyrcellstadiet? Har NE vid tvåcellsstadiet någon effekt på embryots implantationsförmåga och chanserna till levande fött barn efter assisterad befruktning trots högt KIDScore-värde? Kan embryobedömningen på kliniken förbättras genom att ta hänsyn till kärnstatusen i embryon vid tvåcellsstadiet?

Material och metod

Studiedesign

Den retrospektiva kvantitativa registerstudien baserades på data från RMC på USÖ. I studien ingick återförda embryon med fullständig känd implantationsstatus, däribland information om PR, LBR och missfall. I informationen ingick även val av befruktningsmetod (IVF/ICSI), om embryot hade frysförvarats innan återföring (Fresh/Frozen), samt om återföring skedde på dag fem (D5[10]) eller dag sex (D6[11]).

Material

Totalt ingick 1000 embryon från kvinnor ≤45 år och som återfördes mellan januari 2019 och december 2021. Inklusionskriterier var: återförda blastocyster (D5/D6) med fullständiga utfallsdata (PR, LBR och missfall) och KIDScore D5 värde (987 av 1000 blastocyster). Återföringar med embryon som inte hade nått blastocyststadiet exkluderades, liksom återföringar av blastocyster som bedömdes lägre än 3BB enligt Gardner´s Schoolcraft kriterium (se Figur 1). Återföringar av två blastocyster samtidigt som lett till ett barn eller graviditet med ett foster, exkluderades också. Vid samtliga analyser med KIDScore D5 kategorier som utgångsvariabel exkluderades 13 blastocyster på grund av att dessa saknade Time-lapse data och därmed KIDScore D5 data.

Av samtliga återföringar återfördes 813 embryon (81,3%) på D5 medan resterande 187 embryon (18,7%) återfördes på D6. För 414 av embryon återförda på D5 (50,9%) valdes IVF som inseminationsmetod medan ICSI blev valet av metod för 399 embryon (49,1%). Inseminationsmetod för 85 embryon av återföringar D6 (45,5%) var IVF medan 102 embryon (54,5%) inseminerades med ICSI. Av de 1000 embryon som återförts ledde 536 till graviditet, varav 441 resulterade i barn. För detaljer om embryons ålder, färsk eller fryst återföring, befruktningsmetod med mera, se tabell 1. KIDScore-värden för analysmaterialet varierade mellan 1,6-9,8 med en ökad PR och LBR parallellt med ökning av KIDScore-värden (se tabell 2).

[10] D5 står för återföringsdag fem
[11] D6 står för återföringsdag sex

Tabell 1. Tabellen presenterar analysmaterialet fördelat på grupper som totala återförda embryon och embryon återförda dag 5 (D5) respektive dag 6 (D6). I tabellen presenteras information om färska/frysta återföringar, val av inseminationsmetod (IVF eller ICSI) samt frekvens av graviditeter (PR), levande födda barn (LBR) och missfall för samtliga grupper. D6 embryon återförs enbart som frysta/värmda blastocyster, aldrig som färska.

	p - value	Totalt	D5	D6
Blastocyster (n)		1000	813	187
Färska (n)		212	212	-
Frysta (n)		788	601	187
IVF (n)		499	414	85
ICSI (n)		501	399	102
Embryots ålder (år)	n.s*	33 +/- 4	33 ± 4	34 ± 4
PR (%)	<0,001	53,6	56,6	40,6
LBR (%)	<0,001	44,1	45	32,6
Missfall (%)	n.s	9,5	9,8	8,0

* Inte signifikant (not signifikant, n.s) vid analys med Pearsons's Chi^2 test.

Assisterad befruktning

Hormonstimulering, aspiration av oocyter, befruktning, odling, selektion, återföring och frysförvaring följde klinikens standardprotokoll. Samma dag som aspirationen av oocyterna lämnade en eventuell manlig partner ett spermaprov som preparerades för befruktning. Val av inseminationsmetod baserades på spermiekvaliteten och utfallet av eventuella tidigare behandlingar.

När spermieanalys resulterade i ≥1,5 miljoner progressiva spermier/ml efter preparation, inbindning vid antikroppsreaktion <80% samt ingen, låg eller utebliven fertilitet (≥25% av oocyterna befruktades vid insemination) vid tidigare IVF-behandling valdes IVF som metod. ICSI valdes som metod i de fall spermieanalys resulterade i <1,5 miljoner progressiva spermier/ml efter preparation, kraftig antikroppsreaktion med ≥80% inbindning uppstod, låg eller utebliven fertilisering uppkommit vid tidigare IVF-behandling och där frysta spermier använts.

Embryobedömning och embryoselektion med Time-lapse imaging

Efter befruktning placerades oocyterna i odlingsmedium och sedan i en time-lapse inkubator Embryoscope (Vitrolife, Göteborg, Sverige) där embryot fotograferades vart 15:e minut och fotografierna sparades på en server. All bedömning skedde sedan i EmbryoViewer (Vitrolife).

KIDScore-värde genererades automatiskt baserat på embryologens annoteringar i systemet för parametrarna t2, t3, t4, t5 och tB för att dokumentera celldelningstempo, samt expansionsgraden, ICM och TE, där varje blastocyst erhöll ett värde mellan 1,0–9,9. Alla fall med KIDScore-värde <5 kategoriserades som KID <5, medan resterande fall kategoriserades med en poängsintervall (se tabell 2). De fall som saknade KIDScore kategori exkluderades från utfallsanalys av datamaterial med KIDScore-värde som utgångsvariabel. Embryon bedömdes med Gardner´s Schoolcraft kriterium; expansionsgrad (ett till sex) samt kvalitet på ICM och TE (A, B eller C). Blastocyster med en sammanlagd score över 3BB ansågs vara högkvalitativa och återfördes till den kvinnliga patienten eller frysförvarades. I undantagsfall återfördes sämre blastocyster efter konsultation med behandlande läkare.

Tabell 2. Tabellen visar återförda blastocyster med fullständig KIDScore D5 data (totalt 987 embryon), samt antal och graviditeter och graviditetsfrekvens (PR), antal och frekvens av levande födda barn (LBR) och antal och frekvens av missfall, fördelat på KIDScore D5 kategorier.

	Totalt	PR		LBR		Missfall	
	n	n	%	n	%	n	%
KID >9	151	99	65,6	88	58,3	11	7,3
KID 8-9	191	120	62,8	98	51,3	22	11,5
KID 7-8	169	99	58,6	79	46,7	20	11,8
KID 6-7	234	113	48,3	93	39,7	20	8,5
KID 5-6	138	52	37,7	44	31,9	8	5,8
KID <5	104	44	42,3	30	28,8	14	13,5
Totalt	987	527	53,4	432	43,8	95	9,6

Bedömning av kärnstatus

Bedömning av embryon baserades på kärnstatusen i tvåcellsstadiet och i fyrcellstadiet. Vid tvåcellsstadiet kategoriserades embryon baserat på om avvikelsen uttrycktes i en blastomer (NE^1), i båda blastomerer (NE^2) eller i ingen blastomer (No NE). Embryon med NE i tvåcellsstadiet kategoriserades ytterligare på fenotyperna samt om NEP uttrycktes i båda blastomerer eller i en blastomer efter följande kategorier: NE^{bi} respektive NE^{1bi}/NE^{2bi} vid binukleation samt vid binukleation i en eller två blastomerer, NE^{mikro} respektive NE^{1mikro}/NE^{2mikro} vid mikronukleation, NE^{split} respektive NE^{1split}/NE^{2split} vid splittrad nukleation, samt NE^{multi} respektive NE^{1multi}/NE^{2multi} vid multinukleation. I de fall embryon uttryckte olika NEP i varje blastomer kategoriserades dessa som NE^{mixed}. Embryon med NE vid fyrcellstadiet kategoriserades som NE^4, medan embryon som återhämtat sig från NE till fyrcellstadiet bedömdes som reversibla. Bedömningen gjordes av erfaren embryolog.

Dataanalys och statistik

Fisher´s exakta t-test användes för de analyser där variabeln bestod av färre än fem grupper, bland annat för analys av frekvensen av embryon med och utan NE och vid analys av eventuella skillnader mellan D5 och D6. För att bedöma huruvida signifikant skillnad mellan samtliga utgångsvariabler och utfallsvariabler förelåg utfördes Pearson´s Chi^2-test för samtliga analyser. Databearbetning och sammanställning av resultat utfördes i Microsoft® Excel version 16.57 2023, och i IBM SPSS Statistics Version 29.0.0.0 (241) 2022. Om P-värdet vid både Fisher´s exakta t-test och Pearson´s Chi^2-test var större än 0,05 indikerade statistiskt signifikant skillnad vid samtliga analyser, vilket också avgjorde om nollhypotesen och mothypotesen skulle förkastas eller bevaras.

För att dra en slutsats från resultaten av analysmaterialet formulerades följande nollhypotes (H_0) och mothypotes (H_1) utformades;

H_0: ingen skillnad föreligger mellan NE i tvåcellsstadiet, och utgångsvariablerna (NE/NEP, återföringsdag samt KIDScore-kategori) har ingen korrelation till utfallsvariablerna.

H_1: skillnad föreligger mellan NE i tvåcellsstadiet, och utgångsvariablerna har en korrelation till utfallsvariablerna.

Etiska överväganden

Den retrospektiva registerstudien av återförda embryon påverkade inte berörda patienters behandling. I samband med sin behandling lämnade patienterna samtycke till att patientuppgifter sparats, att time lapse data sparats, samt att datan kunde användas för utvärdering av verksamheten samt i syfte av förbättringsarbete vad gäller embryoselektionen på kliniken. Dokumenterat godkännande av arbetet som ett kvalitetsarbete erhölls av verksamhetschefen för RMC.

Patientmaterialet pseudonymiserades innan databearbetning påbörjades. Identifierande information med namn, personnummer, sexualitet eller bakomliggande orsak till infertiliteten exkluderades och studenten hanterade inga personuppgifter.

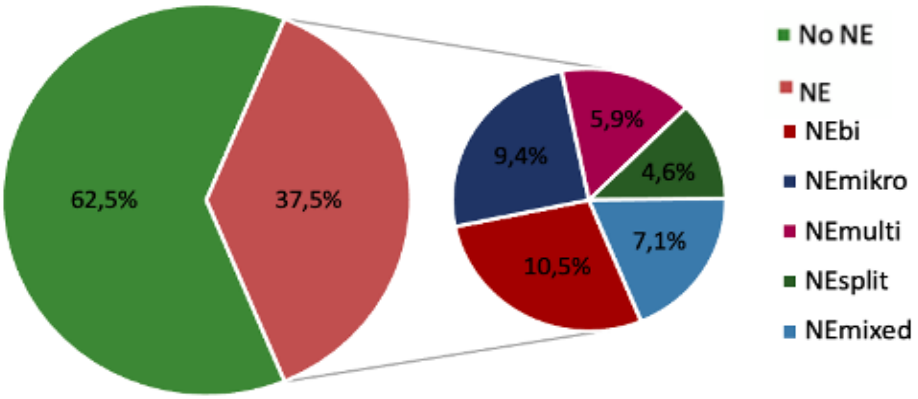
Forskning inom embryoutveckling, embryoselektion och händelser i den tidiga embryoutvecklingen som påverkar chansen till graviditet ska initieras på kliniken. Etiskt tillstånd för detta har skickats in och delar av detta arbete kan eventuellt ingå i forskningen.

Resultat

Förekomst av NE i materialet vid RMC

Incidensen för embryon med NE var 37,5 % (375 av 1000), medan incidensen för embryon utan NE (No NE) var 62,5 %. Frekvensen av NE var högre efter ICSI än efter IVF (44,7 % respektive 30,3 %), medan andelen återförda D5 respektive D6 embryon med NE var ungefär samma (37,5 % respektive 37,4 %). Ingen statistiskt signifikant skillnad i ålder förelåg mellan grupperna No NE och NE (33 ± 4 år för båda grupperna, p>0,05 med Fisher´s exakta t-test).

Embryon med NEP fördelades på följande sätt: 96 embryon uppvisade binukleära kärnor i en blastomer (NE^{1bi}), och 9 embryon hade binukleära kärnor i två blastomerer (NE^{2bi}), vilket motsvarar en incidens på 9,6 % respektive 0,9 %. 83 embryon uppvisade en mikronukleär cellkärna (NE^{1mikro}) medan 2 embryon uppvisade mikronukleära cellkärnor i två blastomerer (NE^{2mikro}), motsvarande 8,3 % respektive 1,1 %. Vidare hade 39 embryon multinukleäritet i en cellkärna (NE^{1multi}) medan 20 embryon hade multinukleäritet i två blastomerer (NE^{2multi}), som motsvarar 3,9 % respektive 2,0 %. 24 embryon hade splittrad cellkärna i en blastomer (NE^{1split}) medan 22 embryon hade splittrade cellkärnor i båda blastomerer (NE^{2split}), motsvarande 2,4% och 2,2%. Slutligen uttryckte 71 embryon blastomerer med mixed errors, vilket motsvarar 7,1% av samtliga återförda embryon med NE. För representation av embryon i tvåcellsstadiet kategoriserat på fenotyper, oberoende om NE fanns i en eller två blastomerer, se Figur 4. För presentation av embryon i tvåcellsstadiet kategoriserat på fenotyper, beroende på om NE fanns i en eller två blastomerer, se Tabell 3.



Figur 4. Figuren visar frekvensen av embryon med och utan nukleära avvikelser (NE) vid tvåcellsstadiet (62,5 % respektive 37,5 %), samt frekvensen av olika fenotyper av NE. Binukleära embryon förekom i högst frekvens oberoende av uttryck i en eller två blastomerer, följt av embryon med mikronukleäritet, mixed errors, multinukleäritet och splittrade cellkärnor.

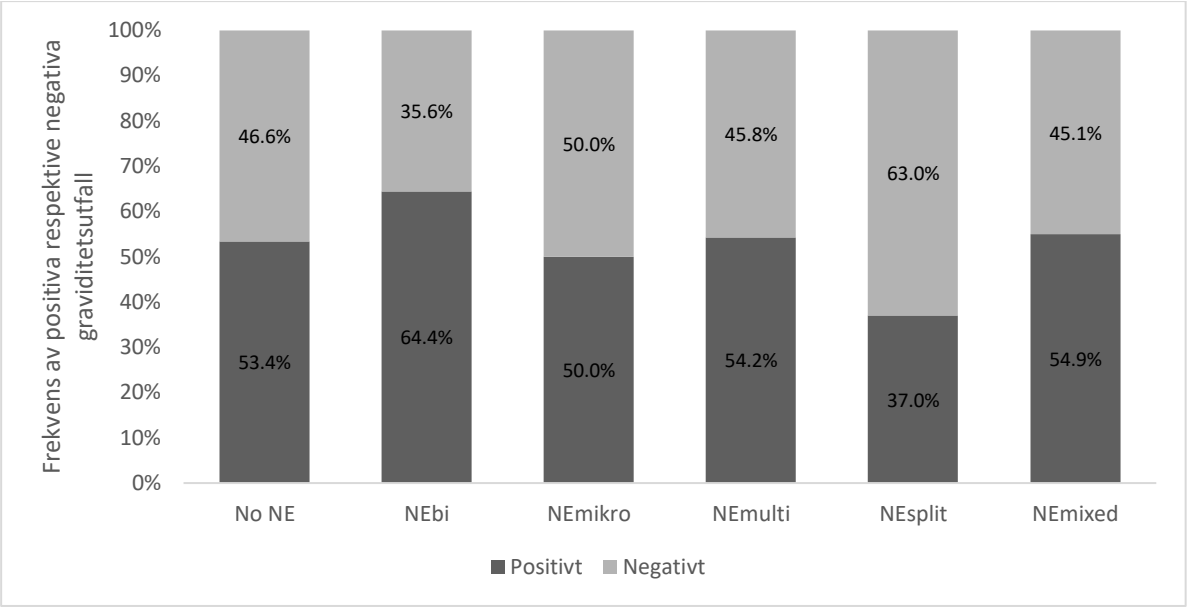
Tabell 3. Tabellen visar incidensen för olika fenotyper av nukleära avvikelser (NEP) uttryckta i en eller två blastomerer (NE^1 respektive NE^2), samt för incidensen av NEP oberoende av uttryck i en eller två blastomerer (kombinerade), i förhållande till totalt återförda embryon med NE.

	NEP (NE^1 respektive NE^2)			NEP (kombinerade)	
	Antal (n)	Andel (%)		Antal (n)	Andel (%)
NE^{1bi}	96	25,6	NE^{bi}	105	28,0
NE^{2bi}	9	2,4			
NE^{1mikro}	83	22,1	NE^{mikro}	94	25,1
NE^{2mikro}	11	2,9			
NE^{1multi}	39	10,4	NE^{multi}	59	15,7
NE^{2multi}	20	5,3			
NE^{1split}	24	6,4	NE^{split}	46	12,3
NE^{2split}	22	5,9			
NE^{mixed}	71	18,9	NE^{mixed}	71	18,9
Totalt	375		Totalt	375	

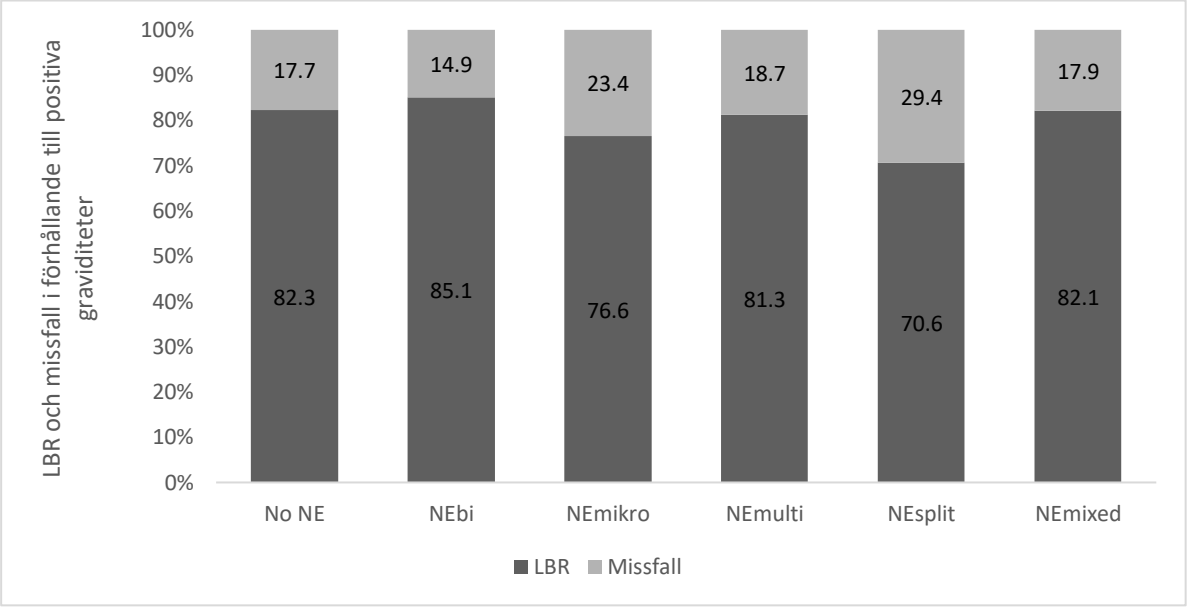
Samband mellan graviditet, levande fött barn, missfall och NEP

PR för återförda embryon utan avvikelser i kärnstatus vid tvåcellsstadiet var 53,4 % (334 av 625 återförda embryon) medan LBR för samma grupp var 44,5 % (278 av 625 återförda embryon). Motsvarande siffra för embryon med avvikelser var PR vid 53,9 % (202 av 375 embryon), och LBR för samma grupp blev 43,5 % (163 barn av 375 återförda embryon). Det förelåg ingen signifikant skillnad mellan grupperna för vare sig PR eller LBR. Ingen signifikant skillnad förelåg vid jämförelse av PR, LBR och missfallsfrekvens mellan embryon av kategorierna No NE, NE^1 respektive NE^2. Signifikant skillnad sågs inte heller när utfallen jämfördes mellan samtliga NEP beroende på om avvikelsen förelåg i en eller två blastomerer.

När embryon kategoriserades efter vilken NEP de bar på, oberoende av uttryck i en eller två blastomerer, förelåg ingen signifikant skillnad PR (se Figur 5). Däremot förelåg signifikant skillnad i LBR och missfall (se Figur 6), där LBR var högst medan missfallsfrekvensen var lägst för embryon med NE^{bi} (85,1 % respektive 14,9 %), följt av embryon med No NE (82,3 % respektive 17,7 %), NE^{mixed} (82,1 % respektive 17,9 %), NE^{multi} (81,3% respektive 18,7 %), NE^{mikro} (76,6 % respektive 23,4%) och NE^{split} sist (70,6 % respektive 23,4 %).



Figur 5. Figuren illustrerar graviditetsfrekvensen (PR) för samtliga embryon kategoriserat på olika fenotyper av nukleära avvikelserna (NE). Frekvensen redovisas i förhållande till totalt återförda embryon för respektive fenotyp (oberoende av uttryck i en eller två blastomerer) och jämförs med PR för embryon utan NE (No NE). Ingen signifikant skillnad förelåg vid statistisk analys med Pearson´s Chi^2-test ($p>0,05$).



Figur 6. Figuren illustrerar frekvensen av levande födda barn (LBR) och missfallsfrekvensen för samtliga embryon kategoriserat på olika fenotyper av nukleära avvikelserna (NE). Frekvenserna redovisas i förhållande till totalt återförda embryon för respektive fenotyp (oberoende av uttryck i en eller två blastomerer) och jämförs med PR för embryon utan NE (No NE). Signifikant skillnad förelåg vid statistisk analys med Pearson´s Chi^2-test ($p<0,05$).

Chansen att få barn efter behandling med embryon som uttryckte NE var signifikant högre i gruppen med binukleära blastomerer, NE^{bi} (54,2 %) jämfört med chansen att få barn efter behandling med embryon som visade splittrade cellkärnor, NE^{split} (26,1 %). Lägst missfallsfrekvens observerades bland embryon med NE^{bi} (9,5 %), medan högst missfallsfrekvens observerades bland embryon med NE^{mikro} och NE^{split}. För detaljerad sammanställning av PR, LBR och missfallsfrekvensen oberoende på om embryon uttryckte NE^1 respektive NE^2, samt detaljerade sammanställning av samtliga utfallsvariabler oberoende på om embryon uttryckte NE^1 respektive NE^2, se tabell 4.

Tabell 4. Tabellen presenterar graviditetsfrekvens (PR), levande fött barn (LBR) och missfallsfrekvens i förhållande till totala antalet återförda embryon med nukleära avvikelser (NE) vid tvåcellsstadiet, oberoende av uttryck i en eller två blastomerer. Högst PR och LBR, samt lägst missfallsfrekvens observerades i embryon med binukleäritet, medan lägst PR och LBR, samt högst missfallsfrekvens observerades i embryon med mikronukleäritet och splittrade cellkärnor. Ingen statistiskt signifikant skillnad förelåg vid analys med Pearson´s Chi^2-test ($p>0,05$).

	Totalt	PR		LBR		Missfall	
	(n)	n	%	n	%	n	%
NE^{bi}	105	67	63,8	57	54,2	10	9,5
NE^{mikro}	94	47	50,0	36	38,3	11	11,7
NE^{multi}	59	32	54,2	26	44,1	6	10,2
NE^{split}	46	17	37,0	12	26,1	5	10,9
NE^{mixed}	71	39	54,9	32	45,1	7	9,9
Totalt	375	202	53,9	163	43,5	39	10,4

Reversibilitet hos embryon med NE

Av samtliga embryon med NE vid tvåcellsstadiet hade 277 (73,9%) reparerats till fyrcellsstadiet, medan 85 (22,7%) var fortsatt avvikande i fyrcellsstadiet, och resterande 13 (3,5%) var icke bedömbara. Ingen signifikant skillnad förelåg vid jämförelse av NEP beroende på om embryon uttryckte NE^1 eller NE^2. Däremot förelåg signifikant skillnad i reversibilitet mellan de olika NEP oberoende av uttryck i en eller två blastomerer (se tabell 5). Reversibilitetsfrekvensen var högst bland embryon som bar på NE^{mikro} (87,2 %), följt av embryon med NE^{multi} (73,3 %), NE^{bi} (76,2 %), NE^{mixed} (66,2 %) och NE^{split} sist (50,0%).

PR och LBR för samtliga reversibla embryon fastställdes till 56,3% (156 av 277 embryon med reversibilitet) respektive 45,1% (125 av 277 embryon med reversibilitet). Embryon med NE^{bi} utgjorde störst andel med 35,9 % PR (56 av 156 graviditeter) respektive 38,4 % LBR (48 av 125 barn), medan embryon med NE^{split} utgjorde lägst andel med 5,8 % PR (9 av 156 graviditeter) respektive 5,6 % LBR (7 av 125 levande födda barn).

Tabell 5. I tabellen presenteras reversibilitetsfrekvens hos embryon med nukleära avvikelser (NE) i blastomerer vid tvåcellsstadiet i förhållande till återförda embryon inom respektive kategori. Signifikant skillnad förelåg vid statistisk analys med Pearson´s Chi^2-test ($p>0,05$), där reversibilitetsfrekvensen var högst bland embryon med mikronukleäritet, följt av embryon med multinukleäritet (NE^{mikro}), binukleäritet (NE^{bi}), mixed errors (NE^{mixed}) och splittrade cellkärnor (NE^{split}).

	Totalt	Reversibel		Icke-reversibel		Ej bedömbar	
	n	n	%	n	%	n	%
NE^{bi}	105	80	76,2	17	16,2	8	7,6
NE^{mikro}	94	82	87,2	11	11,7	1	1,1
NE^{multi}	59	45	76,3	13	22,0	1	1,7
NE^{split}	46	23	50,0	22	47,8	1	2,2
NE^{mixed}	71	47	66,2	22	31,0	2	2,8
Totalt	375	277	73,9%	85	22,7	13	3,5

Samband mellan KIDScore D5 och NEP

Frekvensen av embryon med NE i samtliga KIDScore kategorier varierade mellan 35,1 % och 44,4 %, utan signifikanta skillnader, vare sig mellan embryon med och utan NE, eller mellan KIDScore kategorierna (se Tabell 6). Signifikant skillnad sågs inte heller mellan kategorierna av NE beroende, respektive oberoende på om avvikelsen förelåg i en eller två blastomerer vid tvåcellsstadiet vid fördelning på KIDScore kategorier (se Tabell 7).

Tabell 6. Tabellen presenterar frekvensen av embryon i tvåcellsstadiet som tillhör No NE och NE för varje KIDScore kategori. Ingen signifikant skillnad förelåg vid statistisk analys med Pearson´s Chi^2test ($p<0,05$).

	KID <5	KID 5-6	KID 6-7	KID 7-8	KID 8-9	KID >9
No NE (%)	64,4	62,3	63,2	55,6	62,8	64,9
No NE (n)	67	86	148	94	120	98
NE (%)	35,6	37,7	36,8	44,4	37,2	35,1
NE (n)	37	52	86	75	71	53
Totalt (n)	104	138	234	169	191	151

Tabell 7. Tabellen presenterar frekvensen av embryon som uttrycker nukleära avvikelser (NE) av olika fenotyper i KIDScore kategorierna <5 till och med KID 9,9. Ingen signifikant skillnad förelåg vid statistisk analys med Pearson´s Chi^2test ($p<0,05$).

	NE^{bi} (%)	NE^{mikro} (%)	NE^{multi} (%)	NE^{split} (%)	NE^{mixed} (%)
KID 9-9,9	15,4	13,8	18,6	4,4	15,7
KID 8-9	23,1	18,1	15,3	15,2	20
KID 7-8	19,2	21,3	15,3	17,4	24,3
KID 6-7	19,2	19,1	32,2	32,6	20
KID 5-6	14,4	18,1	8,5	15,2	11,4
KID <5	8,7	9,6	10,2	15,2	8,57

PR och LBR var signifikant högre hos embryon med NE än embryon utan NE i kategorierna KID 7-8 och uppåt, medan motsvarande värden för gruppen var signifikant lägre i kategorierna 6-7 och nedåt. Dessutom förelåg skillnader i KIDScore kategorierna KID 5-6 och KID 7-8, där PR och LBR hos embryon med icke reversibla NE var signifikant högre än embryon med reversibla NE. Motsvarande värden i kategorierna KID <5 och KID 6-7 var signifikant lägre för embryon med icke reversibla NE, än för embryon med reversibla NE. För detaljerade resultat av PR och LBR för embryon enligt ovanstående kategorier, se Tabell 8.

Tabell 8. Tabellen visar graviditetsfrekvens (PR) och frekvens av levande födda barn (LBR) för olika KIDScore-kategorier, beroende på närvaron av nukleära avvikelser (NE) och om de var reversibla eller inte. Pearson's Chi2-test visade signifikant skillnad ($p<0,05$). Högre PR och LBR observerades för KIDScore kategorierna KID 7-8 och uppåt. Embryon med reversibla NE i kategorierna KID <5 och KID 6-7 hade högre PR och LBR än de med icke reversibla NE.

		KID <5	KID 5-6	KID 6-7	KID 7-8	KID 8-9	KID >9
No NE	PR (%)	43,3	40,7	49,3	56,4	62,5	61,2
	LBR (%)	32,8	32,6	39,2	50,0	50,0	55,1
NE	PR (%)	40,5	32,7	46,5	61,3	63,4	73,6
	LBR(%)	21,6	30,8	40,7	42,7	53,5	64,2
NE	PR(%)	44,4	29,0	53,6	58,3	63,8	74,7
Reversibel	LBR(%)	25,9	25,8	46,4	40,0	55,2	62,8
NE	PR (%)	37,5	41,2	32,1	66,7	72,7	70,0
Ej reversibel	LBR (%)	12,5	41,2	26,8	50,0	54,5	70,0

Diskussion

Incidens av NE i materialet vid RMC

Syftet med detta projekt har varit att förbättra embryoselektionen vid RMC på USÖ genom att undersöka korrelationen mellan NE och utfallsvariablerna PR, LBR och missfallsfrekvensen. Dessutom studerades eventuell koppling mellan NE och KIDScore D5. Målet med studien var att den skulle bidra till en bättre förståelse för vilka faktorer som påverkar graviditetsutfallet för att kunna dra en rimlig slutsats och därmed minska behandlingstiden för graviditet hos patienter vid RMC på USÖ.

Resultaten visar att förekomsten av embryon med NE var lägre än förekomsten av embryon utan NE. Detta stämmer in med resultaten från tidigare studier (13), och innebär att en stor andel av embryon återförda från RMC hade NE. I materialet observerades även högre frekvens av NE efter ICSI jämfört med IVF, vilket kan tyda på att ICSI kan vara en riskfaktor för NE. Det finns flera möjliga orsaker till detta, bland annat sker fertilisering vid ICSI under mindre optimala förhållanden i en öppen miljö där gameterna exponeras för olika miljöfaktorer som kan ha negativ inverkan på embryots utveckling och implantationsförmåga (17). Dessutom utförs ICSI i de fall där spermieanalysen visar sämre resultat, så att lågt antal och låg motilitet hos spermierna kan vara en faktor som ökar risken för NE vid ICSI (1). Vid ICSI väljs vanligtvis de mest morfologiskt normala spermier för injektion, men även dessa kan ha genetiska avvikelser som inte ger morfologiskt uttryck (17).

NEP delades upp i olika fenotyper beroende på om avvikelsen förekom i en eller två blastomerer i embryon vid tvåcellsstadiet. Embryon slogs sedan ihop baserat på fenotyperna oberoende på om avvikelsen förekom i en eller två blastomerer i embryon vid tvåcellsstadiet i den fortsatta analysen, efter att ha konstaterat att det inte förelåg skillnader mellan embryon med NEP i en blastomer, jämfört med NEP i två blastomerer. I likhet med en retrospektiv registerstudie vid Reproduktionsmedicinskt Centrum på Torontos Universitetssjukhus i Kanada visade vår analys att embryon som uttryckte NE^{bi} förekom i högst frekvens (10,5 %), följt av NE^{mikro} (9,4 %) och NE^{multi} (7,1 %) (15). I en annan retrospektiv registerstudie i Norge utgjorde dessa NEP också högst frekvens, men i en annan ordning där embryon som uttryckte NE^{bi} och NE^{multi} förekom i högst frekvens (7). Detta pekar på variationer i förekomsten av de olika NEP mellan olika studiepopulationer. Dessutom var frekvensen av NE^{1} högre än frekvensen av NE^{2}. Hade fler embryon ingått i studiematerialet hade det eventuellt gått att utföra alla analyser utan

sammanslagningar, vilket hade kunnat påvisa effekten av NEP ännu mer i detalj. För en detaljerad sammanställning av frekvensen av samtliga fenotyper, se Bilaga 1, Tabell 1.

Det finns ingen klar förklaring till varför vissa NEP, som NE^{bi} eller NE^{mikro}, är vanligare än andra NEP såsom NE^{split}. En möjlig teori är att embryon ibland kan exkludera avvikande blastomerer under celldelningen vilket kan resultera i partiella blastocyster, eller embryon med förlust av blastomerer, som har reducerad implantationsförmåga (24,25). Detta kan bero på att dessa embryon har kromosomala avvikelser (26), och att det finns variationer i graden av exkludering av blastomerer mellan embryon (24) som påverkar förekomsten av olika NEP.

Korrelationen mellan graviditet, levande fött barn samt missfall och NEP

Vid analys av korrelationen mellan PR, LBR och missfallsfrekvens mellan grupperna No NE och NE, påvisades inga signifikanta skillnader i helhet. Däremot är det värt att notera att PR och LBR var högre för embryon utan NE än embryon med NE (se Tabell 8). Det observerades heller inte någon signifikant skillnad i PR, LBR eller missfall vid jämförelse mellan samtliga NEP beroende på om embryon uttryckte NE^{1} eller NE^{2} (se Bilaga 1, Tabell 1). Däremot observerades signifikant skillnad i LBR och missfallsfrekvens vid analys av embryon med NEP oberoende av uttryck av NE^{1} eller NE^{2} (se Figur 6 och Tabell 4), förmodligen för att sammanslagningen gav större grupper och mer styrka i beräkningarna. Högst framgång i PR och LBR, samt lägst missfallsfrekvens observerades bland embryon som uttryckte NE^{bi}, följt av embryon som uttryckte NE^{mixed}, NE^{multi} och No NE, medan lägst framgång i PR och LBR och högst missfallsfrekvens observerades bland embryon som uttryckte NE^{mikro} och NE^{split}.

Vid den retrospektiva registerstudien vid Torontos Universitetssjukhus jämfördes kromosomala mönster hos embryon som uttryckte NE^{bi} respektive NE^{mikro} med hjälp av cytogenetisk analys med fluorescens *in situ* hybridisering (15), vilket innebär att kromosomerna färgas in och analyseras (27). Med hjälp av Time-lapse imaging teknologi identifierades kromosomal nedbrytning, vilket gav upphov till separata mikrotubuli och därmed kontinuerlig celldelning av avvikande dotterceller. Analysen visade att embryon som uttryckte NE^{bi} hade färre kromosomala avvikelser än embryon som uttryckte NE^{mikro}. Studien visade också att behandlingar med embryon som uttrycker NE^{mikro} hade högre missfallsfrekvens än embryon som uttryckte NE^{bi}, vilket pekar på en korrelation mellan kromosomala avvikelser, mikronukleäritet och högre missfallsfrekvens. Det är dock viktigt att notera att

urvalsstorlekarna för grupperna som ingick i den kanadensiska studien var små, vilket begränsade den statistiska signifikansen (15).

Vid en annan retrospektiv registerstudie vid fertilitetskliniken på Köpenhamns sjukhus i Danmark analyserades utfallen av totalt 1314 singel transfers där utfallen av behandlingar med binukleära embryon undersöktes. Studien resulterade i att embryon som uppvisade NE^{2bi} utvecklades till fler högkvalitativa blastocyster än embryon med No NE. Vid återföringar av embryon med andra NE än binukleäritet resulterade detta i betydligt lägre PR och LBR jämfört med embryon med NE^{1bi} eller NE^{2bi}, respektive embryon med No NE. Det framgår dock inte hur många av samtliga embryon med NE^{2bi} som resulterade i graviditet och levande födda barn, vilket gör det svårt att tolka om PR och LBR är angivna i förhållande till samtliga graviditeter i studien, eller till återförda embryon som uttryckte NE^{2bi} (22). Däremot stärker resultaten av materialet vid RMC på USÖ (se Bilaga 1, Tabell 1) påståendet om effekten av embryon med NE^{bi} och NE^{mikro}, då samma mönster har observerats vid andra studier (15,22).

Forskning har visat att partiella blastocyster har haft lägre framgång i PR och LBR, samt högre missfallsfrekvenser. I studien observerades dessutom att ju tidigare i embryoutvecklingen som förlusten av blastomeren inträffade, desto sämre blev graviditetsprognosen bland patienterna. Man såg även ett mönster där ökad förlust av blastomerer hade en negativ korrelation till frekvensen av levande födda barn, men att behandlingar med embryon som har utvecklats till partiella blastocyster och som lett till levande födda barn inte har gett några negativa neonatala resultat. Ett annat mönster som sågs var att frekvensen av partiella blastocyster var högre bland blastocyster som hade behandlats med ICSI (28), vilket talar för att ICSI kan vara en riskfaktor för NE (17), som i sin tur eventuellt kan vara en riskfaktor för partiella blastocyster.

Reversibilitetsfrekvens bland embryon med NE i materialet vid RMC

Resultaten från den här studien kan kopplas till tidigare studier som har undersökt reversibilitet av NE i embryon. Studien visar att majoriteten av embryon med NE vid tvåcellsstadiet hade förmågan att reparera till fyrcellsstadiet med en reversibilitetsfrekvens på 73,9 %. Detta resultat ligger i linje med tidigare studier där reversibilitetsfrekvensen har varierat mellan 73,4 % och 89,6 % (7,13). Överensstämmelsen mellan resultaten från denna studie och tidigare studier stärker pålitligheten av resultaten och ger en bredare förståelse av NE i embryon. Resultaten visar även att NE^{split} hade den lägsta reversibilitetsfrekvensen, medan frekvensen av reversibilitet var högre bland resterande NEP, och högst för embryon med NE^{mikro}. Dock finns

det inga studier som har undersökt förhållandet mellan reversibilitet och olika typer av NEP, vilket innebär att mer forskning behövs för att kunna påvisa eventuella samband.

Samband mellan NEP och KIDScore D5 respektive reversibilitet

Trots icke signifikanta skillnader i frekvens av embryon med NE respektive utan NE fördelat på samtliga KIDScore kategorier, förelåg signifikanta skillnader i PR och LBR mellan grupperna. Resultaten visar att PR och LBR var signifikant lägre hos embryon utan NE i de högre KIDScore kategorierna, medan de var högre i de lägre KIDScore kategorierna. Å andra sidan observerades en ökning av PR och LBR i takt med högre KIDScore kategorier. Resultaten visar även att, trots skillnad i frekvensen av de olika NEP i samtliga KIDScore kategorier, fanns inget statistiskt samband. I Tabell 7 noteras högst frekvens av NE^{bi}, NE^{multi} samt NE^{mixed} i de högre KIDScore kategorierna, medan NE^{mikro} och NE^{split} utgör större andelen av embryon i de lägre KIDScore kategorierna för KIDScore D5. Detta innebär att det finns ett samband mellan de olika fenotyperna, KIDScore kategorierna samt utfallen, men ett komplext sådant. I dagsläget finns det inga studier som har undersökt sambandet mellan dessa variabler, vilket gör det svårt att tolka resultaten. Mer forskning behövs för att få mer förståelse och för att kunna dra rimliga slutsatser kring eventuella samband och mekanismer. För detaljerad representation av NEP i samtliga återföringar, samt PR och LBR av de olika NEP i förhållande till KIDScore kategorier, se Bilaga 1, Tabell 2 – 4.

Vid analys och jämförelse av frekvensen av reversibla respektive icke reversibla embryon i samtliga KIDScore kategorier, förelåg ingen signifikant skillnad. Däremot observerades signifikanta skillnader i PR och LBR, där frekvenserna å ena sidan var högre för embryon med icke reversibla NE än embryon utan NE i vissa KIDScore kategorier, å andra sidan lägre i andra KIDScore kategorier (se Tabell 8). Inget regelbundet samband observerades, vilket med stor sannolikhet beror på skillnader i populationsstorleken av de reversibla och icke reversibla embryon.

Vid överskådlig analys och jämförelse mellan återföringarna D5 respektive D6, observerades en successiv ökning i PR och LBR i samband med ökning av KIDScore-värde för embryon återförda D5 (se Bilaga, Tabell 5). Däremot var mönstret mindre regelbundet hos embryon återförda D6. En möjlig förklaring är att KIDScore D5 Algorithm är specifikt utformat för embryon återförda D5, så att när utvecklingen av samtliga parametrar inträffar vid en senare tidpunkt än det optimala enligt algoritmen bedöms det som försenad och nedsatt utveckling. Då

utvecklingshastigheten för embryon som når D6 avtar och skiljer sig från embryon i D5, och eftersom KIDScore D5 baseras på kända implantationsdata för D5 embryon, blir algoritmen otillförlitlig för bedömning av D6 embryon (29).

Slutsats

Studien har visat att embryon som uttrycker NE förekommer i måttlig grad i materialet på RMC. Trotts att det inte förelåg signifikanta skillnader i PR och LBR mellan grupperna No NE och NE, sågs signifikanta skillnader vid kategorisering av NE i olika fenotyper oberoende av uttryck i en eller två blastomerer vid tvåcellsstadiet. Embryon med NE^{bi} utgör störst andel av embryon med NE på RMC, samt har en högre framgångsgrad i graviditet och levande födda barn, än både embryon som uttrycker andra NEP och embryon som bedöms som kliniskt normala. Embryon som uttrycker NE^{split} och NE^{mikro} däremot, har lägst PR och högst missfallsfrekvens. Dessa skillnader hade statistisk betydelse och innebär att, genom att ta hänsyn till kärnstatusen vid tvåcellsstadiet kan embryoselektionen förbättras vid assisterade befruktning för att förbättra prognosen av infertila patienter som genomgår assisterad befruktning. Dessutom stärker resultaten från tidigare studier teorin om att embryon som uttrycker NE^{bi} har större framgång i graviditetsutfall jämfört med exempelvis embryon som uttrycker NE^{split} och NE^{mikro}. Det innebär att embryoselektionen kan förbättras på RMC genom att tillämpa en prioriteringsordning där embryon som uttrycker NE^{bi}, No NE respektive NE^{multi} bedöms som lämpligast för återföring, och därmed kan väljas i första hand. I andra hand kan embryon som uttrycker NE^{mixed}, NE^{mikro} och NE^{split} väljas för återföring. De är dock svårt att dra slutsatser om behandlingsframgången för de senare grupperna, eftersom storleken på dessa grupper var små jämfört med de tidigare grupperna.

Studien har även visat att embryon som uttrycker NE, och som har högt KIDScore-värde, har hög framgångsgrad i graviditet och levande födda barn. Embryon med NE i de högre KIDScore kategorierna kan med fördel väljas framför embryon som bedöms som kliniskt normala. Det innebär att KIDScore D5 Algorithm går att lita på trots att embryon uttrycker NE, i alla fall för embryon återförda D5.

Trotts att signifikanta skillnader har påvisats, och att dessa skillnader kan stärkas med hjälp av tidigare studier i ämnet, krävs att en studie med större embryopopulation utförs. Eventuellt en studie där enbart embryon återförda D5 analyseras och KIDScore D5 data finns för samtliga embryon, samt att inkludera partiella blastocyster som parameter för att undersöka eventuellt

samband till olika NEP. Korrelationsanalyser bör tillämpas för att undersöka huruvida korrelationen mellan NE och NEP i materialet vid RMC, och graviditetschanserna samt levande födda barn är av en slump eller om det finns en faktisk korrelation. Sådana analyser är framför allt nödvändiga vid bedömning av korrelationen mellan KIDScore-värde, reversibilitet samt utfallen graviditet, levande fött barn och missfall. Däremot kan H_0 förkastas då resultaten har visat att signifikanta skillnader föreligger i PR, LBR och missfall mellan de olika NEP, och att utgångsvariablerna har betydelse för utfallen av behandlingarna vid RMC.

Slutord

Jag vill rikta ett stort tack till min handledare, Emma Adolfsson, en framstående biomedicinsk analytiker och senior embryolog vid RMC på USÖ, för hennes ovärderliga vägledning genom mitt arbete. Hennes expertis i ämnet har hjälpt mig utveckla arbetet på ett sätt som annars inte hade varit möjligt. Jag vill även tacka övrig personal vid RMC, som avsatte tid för att ge mig en tydlig genomgång av hur arbetet på kliniken går till, samt för ett väldigt trevligt bemötande. Slutligen vill jag tacka mina närstående som har gett mig både emotionellt stöd, och stöd i att utveckla mitt arbete till vad det är idag.

Referenser

1. Hreinsson J, Hamberger L, Hardarson T. . Infertilitet: utredning och behandling genom assisterad befruktning. Stockholm: Studentlitteratur; 2005.

2. Samuel Webster, Rhiannon de Wreede. Embryology at a Glance (At a Glance) [Elektronisk resurs]. 1. John Wiley & Sons; 2012.

3. Zorrilla M, Yatsenko AN. The Genetics of Infertility: Current Status of the Field. Curr Genet Med Rep. 01 december 2013;1(4).

4. Barak S, Baker HWG. Clinical Management of Male Infertility. I: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, m.fl., redaktörer. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000 [citerad 28 mars 2023]. Tillgänglig vid: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279160/

5. Balakier H, Cadesky K. The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres. Hum Reprod. 01 april 1997;12(4):800–4.

6. Shioya M, Kobayashi T, Sugiura T, Fujita M, Takahashi K. The morphokinetics algorithm based on data from day 5 blastocyst transfer (KIDScoreD5 version 3) is also useful for embryo selection in day 6 blastocyst transfer. Reprod Med Biol. 13 september 2022;21(1):e12484.

7. Sayed S, Reigstad MM, Petersen BM, Schwennicke A, Hausken JW, Storeng R. Nucleation status of Day 2 pre-implantation embryos, acquired by time-lapse imaging during IVF, is associated with live birth. PloS One. 2022;17(9):e0274502.

8. Ciray HN, Campbell A, Agerholm IE, Aguilar J, Chamayou S, Esbert M, m.fl. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. Hum Reprod Oxf Engl. december 2014;29(12):2650–60.

9. Ai J, Jin L, Zheng Y, Yang P, Huang B, Dong X. The Morphology of Inner Cell Mass Is the Strongest Predictor of Live Birth After a Frozen-Thawed Single Embryo Transfer. Front Endocrinol [Internet]. 2021 [citerad 15 april 2023];12. Tillgänglig vid: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2021.621221

10. Figur 1. Kriterier för inre cellmassan, trofektodermet och expansionen enligt Gardner´s Schoolcraft kriterium. llustrator: Sadullah, H.

11. Lundin K, Park H. Time-lapse technology for embryo culture and selection. Ups J Med Sci. maj 2020;125(2):77–84.

12. Berntsen J, Rimestad J, Lassen JT, Tran D, Kragh MF. Robust and generalizable embryo selection based on artificial intelligence and time-lapse image sequences. PLOS ONE. 02

februari 2022;17(2):e0262661.

13. Aguilar J, Rubio I, Muñoz E, Pellicer A, Meseguer M. Study of nucleation status in the second cell cycle of human embryo and its impact on implantation rate. Fertil Steril. augusti 2016;106(2):291-299.e2.

14. Figur 3. Illustration över olika uppsättningar av multinukleäritet, samt mononukleäritet och anukleäritet vid tvåcellsstadiet. Illustrator: Sadullah, H.

15. Meriano J, Clark C, Cadesky K, Laskin CA. Binucleated and micronucleated blastomeres in embryos derived from human assisted reproduction cycles. Reprod Biomed Online. november 2004;9(5):511–20.

16. Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. Fertil Steril. juli 1990;54(1):102–8.

17. Desch L, Bruno C, Luu M, Barberet J, Choux C, Lamotte M, m.fl. Embryo multinucleation at the two-cell stage is an independent predictor of intracytoplasmic sperm injection outcomes. Fertil Steril. 01 januari 2017;107(1):97-103.e4.

18. De Vincentiis S, De Martino E, Buffone MG, Brugo-Olmedo S. Use of metaphase I oocytes matured in vitro is associated with embryo multinucleation. Fertil Steril. 01 februari 2013;99(2):414-421.e4.

19. Boiso I, Martí M, Santaló J, Ponsá M, Barri PN, Veiga A. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. Hum Reprod Oxf Engl. juli 2002;17(7):1885–91.

20. Pickering SJ, Taylor A, Johnson MH, Braude PR. An analysis of multinucleated blastomere formation in human embryos. Hum Reprod Oxf Engl. juli 1995;10(7):1912–22.

21. Desai N, Ploskonka S, Goodman LR, Austin C, Goldberg J, Falcone T. Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. Reprod Biol Endocrinol RBE. 20 juni 2014;12:54.

22. Talbot AL, Alexopoulou E, Kallemose T, Freiesleben N la C, Nielsen HS, Zedeler A. Binucleated embryos at the two-cell stage show higher blastocyst formation rates and higher pregnancy and live birth rates compared to non-multinucleated embryos. Hum Reprod Open. 2022;2022(4):hoac049.

23. Egashira A, Yamauchi N, Tanaka K, Mine C, Otsubo H, Murakami M, m.fl. Developmental capacity and implantation potential of the embryos with multinucleated blastomeres. J Reprod Dev. 2015;61(6):595–600.

24. Hur C, Nanavaty V, Yao M, Desai N. The presence of partial compaction patterns is

associated with lower rates of blastocyst formation, sub-optimal morphokinetic parameters and poorer morphologic grade. Reprod Biol Endocrinol. 28 januari 2023;21(1):12.

25. Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J, Munné S. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. Hum Reprod. 01 september 2001;16(9):1954–8.

26. Çetinkaya CP, Tüfekçi MA, Çolakoğlu YK, Yelke HK, Çetinkaya M, Kahraman ProfS. What is the chromosomal constitution of blastomeres excluded from the formation of a morphologically normal blastocyst? Reprod Biomed Online. 01 april 2019;38:e45–6.

27. Wall MB, Marks K, Smith TA, Gearon CM, Muggleton-Harris AL. Cytogenetic and fluorescent in-situ hybridization chromosomal studies on in-vitro fertilized and intracytoplasmic sperm injected ”failed-fertilized” human oocytes. Hum Reprod Oxf Engl. oktober 1996;11(10):2230–8.

28. Jiang S, Jin W, Zhao X, Xi Q, Chen L, Gao Y, m.fl. The impact of blastomere loss on pregnancy and neonatal outcomes of vitrified-warmed Day3 embryos in single embryo transfer cycles. J Ovarian Res. 18 maj 2022;15:62.

29. Zhang J, Liu H, Mao X, Chen Q, Fan Y, Li Y. KIDScore as a predictor of clinical outcomes in blastocysts at day 5 versus day 6. 34. 2019(9):1739–46.

Bilaga 1

Tabell 1. PR, LBR och missfallsfrekvens i förhållande till antalet återföringar för samtliga NE beroende på om NE uttrycks i en eller två blastomerer i embryon vid tvåcellsstadiet.

	Totalt	PR		LBR		Missfall	
	n	n	%	n	%	n	%
NE^{1bi}	96	61	63,5	51	53,1	10	10,4
NE^{2bi}	9	6	66,7	6	66,7	0	0,0
NE^{1micro}	83	42	50,6	33	39,8	9	10,8
NE^{2micro}	11	5	45,5	3	27,3	2	18,2
NE^{1multi}	39	20	51,3	15	38,5	5	12,8
NE^{2multi}	20	12	60,0	§11	55,0	1	5,0
NE^{1split}	24	11	45,8	8	33,3	2	8,3
NE^{2split}	22	6	27,3	4	18,2	2	9,1
NE^{mixed}	71	39	54,9	32	45,1	7	9,9
Totalt NE	375	202	53,9	163	43,5	39	10,4

Tabell 2. Återföringar med både antal och andel för aktuell KIDScore kategori.

	KID <5		KID 5-6		KID 6-7		KID 7-8		KID 8-9		KID >9		Totalt
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
No NE	67	10,9	86	14,0	148	24,1	95	15,5	120	19,5	98	16,0	614
NE^{bi}	9	8,7	15	14,4	20	19,3	20	19,2	24	23,1	16	15,4	104
NE^{mikro}	9	9,6	17	18,1	18	19,1	20	21,3	17	18,1	13	13,8	94
NE^{multi}	6	10,2	5	8,5	19	32,2	9	15,3	9	15,3	11	18,6	59
NE^{split}	7	15,2	7	15,2	15	32,6	8	17,4	7	15,2	2	4,3	46
NE^{mixed}	6	8,6	8	11,4	14	20,0	17	24,3	14	20,0	11	15,7	70

Tabell 3. PR för samtliga KIDScore kategorier oberoende av uttryck av NE i en eller två blastomerer i embryon vid tvåcellsstadiet.

	KID <5		KID 5-6		KID 6-7		KID 7-8		KID 8-9		KID >9		Totalt
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
No NE	29	8,9	35	10,8	73	22,5	53	16,3	75	23,1	60	18,5	325
NE^{bi}	5	7,5	5	7,5	15	22,4	15	22,4	14	20,9	13	19,4	67
NE^{mikro}	4	8,5	5	10,6	6	12,8	12	25,5	12	25,5	8	17,0	47
NE^{multi}	2	6,3	2	6,3	8	25,0	4	12,5	7	21,9	9	28,1	32
NE^{split}	2	11,8	1	5,9	5	29,4	4	23,5	4	23,5	1	5,9	17
NE^{mixed}	2	5,1	4	10,3	6	15,4	11	28,2	8	20,5	8	20,5	39

Tabell 4. LBR för samtliga KIDScore kategorier oberoende av uttryck av NE i en eller två blastomerer i embryon vid tvåcellsstadiet.

	KID <5		KID 5-6		KID 6-7		KID 7-8		KID 8-9		KID >9		Totalt
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
No NE	22	8,2	28	10,4	58	21,6	47	17,5	60	22,3	54	20,1	269
NE^{bi}	2	3,5	5	8,8	14	24,6	11	19,3	14	24,6	11	19,3	57
NE^{mikro}	2	5,6	4	11,1	4	11,1	8	22,2	10	27,8	8	22,2	36
NE^{multi}	2	7,7	2	7,7	7	26,9	3	11,5	5	19,2	7	26,9	26
NE^{split}	0	0	1	8,3	4	33,3	3	25,0	3	25,0	1	8,3	12
NE^{mixed}	2	6,3	4	12,5	6	18,8	7	21,9	6	18,8	7	21,9	32

Tabell 5. Embryo med NE återförda D5 och D6 fördelat på KIDScore kategorier.

	D5					D6				
	Totalt	PR%		LBR%		Totalt	PR%		LBR%	
	n	n	%	n	%	n	n	%	n	%
KID >9	151	98	64,9	87	57,6	1	1	100,0	1	100,0
KID 8-9	187	118	63,1	96	51,3	4	2	50,0	2	50,0
KID 7-8	156	93	59,6	74	49,0	13	6	46,2	5	38,5
KID 6-7	197	97	49,7	78	39,6	37	16	43,2	15	43,2
KID 5-6	76	34	44,7	30	39,5	62	18	29,0	14	22,6
KID <5	37	14	37,8	9	24,3	67	30	44,8	21	31,3
Totalt	803	454	56,5	374	46,6	184	73	39,7	58	31,5