

BEVEZETÉS

1978-ban a Nature című folyóirat tudatta a világgal, hogy megszületett az első lombikbébi (Steptoe és Edwards, 1978) Angliában. A szenzációs bejelentés időpontját tekintik a világon az asszisztált reprodukciós beavatkozások kezdetének, pedig ezt az eredményt évtizedekig tartó, fárasztó kutatómunka és kísérletezés előzte meg. Louis Brown megszületése mégis az egyik legnagyobb eseménye volt a humán, szervezeten kívüli mesterséges megtermékenyítés történetének. Ezt követték Ausztráliában, Melbourne-ben 1980 júniusában, az USA-ban, Norfolkban 1981. decemberében megszületett lombikbábik.

A kezdete és előzményei azonban sokkal korábbra tehető, amikor Schenknek Bécsben sikerült megtermékenyítenie tengerimalac és nyúl petesejtet és ezek osztódását is sikerült megfigyelnie.

1891-ben Heape sikeres embriótranszfert végzett nyulaknál, ahol is az embriókat a petevezető átmosásával nyerte. Heape munkássága hívta fel a kutatók figyelmét az embriók laboratóriumi tenyésztésének lehetőségére.

Korai embrió fejlődésének tanulmányozása szintén nagyban hozzájárult a szakterület fejlődéséhez.

Az első humán kísérletek több mint 60 év múlva történtek. Rock és Menkin emberi petesejtet inszemináltak in vitro és az embriók első osztódását is meg tudták figyelni kétsejtes állapotban. De Kretznek Ausztráliában már sikerült szervezeten kívüli mesterséges megtermékenyítéssel embernél terhességet létehozni, de ez spontán vetéléssel végződött.

Steptoe és Edwards gyümölcsöző együttműködése 1968-ban kezdődött Londonban a Royal Society of Medicine tudományos ülésén, ahol Steptoe a petefészek és tüszők laparoszkópos felvételeit mutatta meg. Ezt az előadást Robert Edwards fiziológus is meghallgatta, aki az előadás után

beszélgetésbe elegyedett az előadóval. Felvetette azt, hogy ha Steptoe laparoszkóp segítségével petesejtet tudna nyerni, azt ő megpróbálná megtermékenyíteni.

A világstatisztika szerint napjainkban több mint 200 000 az in vitro fertilizáció segítségével megszületett gyermekek száma. Ma már a világ legtöbb országában végeznek lombik bébi programot. Európában 18 ország statisztikája alapján 1997-ben több, mint 200 000 petesejtnyerés történt, amelynek eredményeként 26,1% klinikai terhességi arány jött létre IVF-el és 26,4% ICSI-vel. A „take home baby” arány IVF-re 20,9%, ICSI-re 21,5% volt az ESHRE statisztikája alapján. Az átlagos ikerterhesség aránya 29,6%, amelyből 25,8% kettős iker, 3,6% pedig hármas iker, 0,2% a négyes iker terhesség volt.

Az össz. születésszám kb. 2,5-3,5%-a az IVF eredménye.

Ezen adatok egyértelműen alátámasztják, hogy a szervezeten kívüli mesterséges megtermékenyítés az egész világon elterjedt, rutinszerű orvosi beavatkozássá vált. Az in vitro fertilizáció azonban nem tekinthető kizárólag orvosi beavatkozásnak, gyakorlatilag több tudományág bizonyos részeit összesíti, így a biológia, genetika, molekuláris genetikáét.

Kezdetben az IVF csak a tubáris eredetű meddőség esetén volt alkalmazható.

Későbbiekben a beavatkozás indikációs területe folyamatosan bővült. Megpróbálták a módszert alkalmazni immunológiai, anovulációs eredetű infertilitásnál és endometriosis externánál.

Például az ismeretlen eredetű meddőségben szenvedő párok kezelésére vezette be Asch a GIFT-et (Gameta Intrafallopian Transfer), amikor a petesejtet és a spermiumokat egyidejűleg a petevezető ampulláris részébe juttatta laparoszkóp segítségével, ami bizonyos esetekben az in vitro fertilizáció alternatíváját jelentheti. Ezt a módszert a későbbiekben

transzcervikálisan, hasi ultrahang ellenőrzés mellett végezték. Devroey a már osztódó embriókat a petevezetőbe juttatta laparoszóppal (Zygote Intrafallopian Transfer, ZIFT), aminek segítségével az embriók természetes körülmények között fejlődhetnek. Jansen és munkatársai már laparoszóp használata nélkül, transzcervikálisan juttatták az embriókat a petevezetőbe katéterezéssel (Tubal Emryo Transfer, TET).

A kilencvenes évek kezdetétől egyre több próbálkozás történt, hogy a szervezeten kívüli mesterséges megtermékenyítés módszerét kiterjesszék a férfi eredetű infertilitás eseteire is. A kérdés fontosságát az húzza alá, hogy az infertilis házasságok és párkapcsolatok közel felében a spermatogenezis, spermium transzport tehető felelőssé a gyermektelenségért.

Amennyiben a spermiumok minősége és mennyisége nem volt megfelelő, illetve immunológiai pozitívitás esetén, a tradicionális IVF sikertelen volt hiába próbálkoztak meg a spermium koncentrációjának növelésével (HIC), vagy a férfi partner hónapokig tartó injekciós kezelésével.

Az igazi áttörést az jelentette, amikor a spermiumot mikromanipulációval juttatták a petesejt különböző részeibe váltakozó eredményességgel. Palermo és mtsai ismerték fel, hogy a spermiumot mozgásában gátolni kell a beavatkozás előtt, úgy, hogy a farki részt borító hártya sérülésével enzim aktiváció érhető el és az így előkészített spermiumot kell a zona pellucidán keresztül bejuttatni a petesejt citoplazmájába. Az eljárás módosítása átütő sikerrel járt. A világon széles körben elterjedt, új módszer neve ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection). A módszer rendkívüli eredményessége miatt napjainkban a szervezeten kívüli mesterséges megtermékenyítés 60-70%-a ICSI-vel történik és 30-40%-a csak a tradicionális IVF.

Későbbiekben a szövettenyésztés során az embriológusok azt is megfigyelték, hogy a fejlődő embrió számára a petevezető folyadék

(Human Tubal Fluidum, HTFL) előnyösebb környezetet jelent, mint a mesterségesen megalkotott táptalajok. 1978-tól a kilencvenes évek elejéig az embriókat a petesejt vételtől számított először két, majd három napig tenyésztették, maximum hat – nyolc sejtjes állapotig. Természetes körülmények között az embrió, a petevezetőben vándorol és osztódik, majd öt – hét napos korban kerül a méhüregbe és implantálódik a méh nyálkahártyájába. Az IVF eredményeinek javítása érdekében állandó törekvés a szakemberek számára, hogy az embriókat öt – hét napos korban, blasztociszta stádiumban helyezték a méhüregbe.

A kokultúrák Bongso és munkatársai, míg a szekvenciális táptalajok alkalmazása a Gardner féle módszerrel, már lehetővé tette a blasztociszta állapotban történő embriótranszfert.

Lehetővé tette és egyszerűsítette a petefészek stimulációjának ellenőrzését és a fejlődő tüszők leszívását a petesejt aspirációt a transzvaginális ultrahang technika, ezen gyors és egyszerű módszer kiszorította a laparoszópiás petesejt nyerést.

Fontos előrelépést jelentett a petefészek stimuláció területén olyan új gyógyszerek bevezetése, aminek segítségével több és jobb minőségű petesejt állt rendelkezésre a szövettenyésztés céljaira. A GnRH analógok és a tisztított urin-FSH készítmények alkalmazása, majd a rekombináns géntechnológiával előállított, igen nagy tisztaságú gyógyszerek megjelenése a kontrollált petefészek stimulációt és így az IVF-programok eredményességét fokozza.

CÉLKITŰZÉSEK – KÉRDÉSFELVETÉS

A Szent János Kórházban, a Budai Meddőségi és In Vitro Fertilizációs Centrum 1992. augusztus 11-e óta folyamatosan működik. A centrum nemcsak in vitro fertilizációval, hanem az infertilitás okainak kivizsgálásával és kezelésével foglalkozik a modern asszisztált reprodukciós technikák széles skálájának alkalmazásával. Az elmúlt kilenc év alatt 3210 in vitro fertilizációs ciklusból 970 klinikai terhesség jött létre (30,2%), ebből 706 esetben élveszülés zajlott le (22%), melynek eredményeképpen 918 gyermek született meg (a többesterhességek 30%-s előfordulásának gyakorisága miatt).

Az értekezésben kidolgozott témák az asszisztált reprodukció embriológiai oldalának terén végzett mindennapos gyakorlati tevékenység során felvetődött problémákból adódtak, amelyek a következők voltak:

1. Bár az In Vitro Fertilizációs kezelések terhességi aránya elérheti egy kezelési ciklus után a 30%-s sikerarányt és a 20-25%-s „take home baby” arányt, ennek ellenére a cumulatív terhességi arány ötszöri beavatkozás után sem éri el a 70%-t. Ennek oka, a 35-40 év feletti, relatíve magas női kor és az úgynevezett „poor responders” magas aránya az IVF-s párok között, ami azt jelenti, hogy ezen betegcsoportban kevés és váltakozó, - gyakran rossz minőségű petesejt nyerhető csak, ami csökkenti, vagy lehetetlenné teszi terhesség elérésének esélyét.
2. A szövettenyésztés második, harmadik napján végzett embrió transzfer esetén a négy-nyolc sejtes embriók közül kell kiválasztani morfológiai kritériumok alapján a behelyezésre kerülőket. Ebben az

időben még nem tudjuk megmondani, hogy melyek az igazán életképes preembriók, amelyek a méhüregben tovább osztódnak és beágyazódásra kerülhetnek, mivel ebben az időszakban az embriók 50%-a osztódási blokk miatt nem folytatja a fejlődést.

3. Jól ismert tény, hogy természetes körülmények között a petevezetőben megtermékenyült petesejtek, majd embriók öt nap vándorlás után, mialatt folyamatosan osztódnak, a ciklus 20-21. napján úgynevezett blasztociszta állapotban kerülnek a méhüregbe, ahol ideális esetben a beágyazódás történik. Erre az időszakra az endometrium felkészült az embrió befogadására, úgynevezett midluteális fázisban van. A blasztociszta állapotnak a nyálkahártya midluteális fázisa felel meg, ekkor van szinkronban az embrió és endometrium fejlettsége.

A második és harmadik napon végzett transzfernél a nyálkahártya igazából még nem fejlett eléggé az embrió befogadására, vagyis aszinkronitás áll fent az embrió és az endometrium fejlettségi állapota között.

4. Jól ismert tény, hogy a petesejt aspiráció után két, három nappal a méh kontrakció készsége fokozott, tehát az ebben az időszakban végzett embrió behelyezésnél az embrió kilökődésének kockázata fokozott. Később azonban ez a görcskésztség csökken és így az úgynevezett késői embrió transzfer esetén kevesebb kontrakció váltódik ki és ezáltal növekszik az implantáció esélye.

Vizsgálataim folyamán ezen problémák megoldásának céljából, két alapvető kérdésre kerestem a választ.

- A.** Lézer asszisztált hatchinggel fokozható-e a terhességi sikerarány, a magasabb női kor, a többszöri sikertelen IVF-ET, emelkedett bazális FSH érték, vastag zona pellucida esetén? Biztonságosan alkalmazható-e a lézer asszisztált hatching? Milyen hatással van a lézer asszisztált hatching alkalmazása az utódok egészségi állapotára?
- B.** Jelent-e előrelépést az úgynevezett öt napos, blasztociszta transzfer alkalmazása az in vitro fertilizáció mindennapi gyakorlatában? Milyen esetben és milyen gyakorisággal alkalmazható a blasztociszta kultúra? Növeli-e a blasztociszta tenyésztés az implantációs arányt? Mennyiben befolyásolja a módszer a terhességi arányt?

ANYAG ÉS MÓDSZER

LAH INDIKÁCIÓJA

A LAH indikációs területe a következő volt: az életkor (több mint 35 év) és / vagy korábban végrehajtott, legalább 3 sikertelen IVF-ET.

A Szent János Kórház Budai Meddősegi Centrumában 1998. február 28-án indítottuk el non-contact lézerrel végzett, asszisztált hatching programunkat.

SZÖVETTENYÉSZTÉS és LAH

A pároknál rutinszerű in vitro fertilizációs programot végeztünk, amelyet tradicionális IVF, vagy ICSI követett. A petesejteket, zygótákat és embriókat standard körülmények közt kezeltük. A megtermékenyítést

követően 18-24 óra elteltével értékeltük a fertilizációt. Ezután a megtermékenyült zigótákat Petri csészébe (Falcon, 3001, USA) helyeztük, amelyben IVF (Medicult) vagy IVF-100 (Vitrolife) táptalaj 50 µl-s cseppjei voltak, s ezt 500 µl ásványi olajjal (Sigma) fedtük le.

Az lézer hatchinget a második napon hajtottuk végre, amikor az embriók a 2-3-4-5-6 sejtes állapotban voltak. A 670 nm-es dioda és a kollimált 1.48 µm-es lézersugarakat az invert mikroszkópba tükrrendszeren keresztül jutott, amit a mikroszkóp 10 µm átmérőjű, kör alakú területre koncentrált. Általában így az objektív képsíkjában 47 mW teljesítmény érhető el. A zona pellucidát 10-15 ms-os lézersugár hatásnak tettük ki. A lyuk átmérőjének mérete 5-10 µm között változott az időtől és a táptalaj hőmérsékletétől függően.

Átlagosan 2, maximum 3 lövést hajtottunk végre. Mivel az embriókat nem kell fixálni, ezért sem mikromanipulatorra sem pipettákra nincs szükség. Bármilyen manapság elterjedt szövettenyésztő edény és táptalaj használható a beavatkozás alatt. A zona pellucida átlukasztásának pontossága és reprodukálhatósága egy microméter pontossággal végezhető. A behatás időtartama 40-90 millisekundumot vesz igénybe. Az embrió transzfer 24 órával később, a harmadik napon végeztük el, az embriók mikroszkópos ellenőrzése után.

MECHANIKUS HATCHING

Mechanikus hatching, más néven parciális zona disszekció. Ehhez a módszerhez elengedhetetlenül fontos mikromanipulátorok használata. Mielőtt megkezdődne a beavatkozás le kell tisztítani teljesen az embriót a korona sejtektől. Az embriókat HEPES tartalmú táptalajba, mikrocseppbe helyezük, majd az egészet lefedjük paraffin olajjal. A szövettenyésztő

edényt a 37°C-ra termosztált invert mikroszkóp tárgyasztalra helyezük. Az embriót megfogjuk a tartó pipettával, a vele ellentétes oldalon lévő speciális PZD pipettával, mely igen vékony és hegyes, átszűrjük a zona pellucidát egy vagy öt óra irányából indulva 2 pontban, úgy, hogy a blasztomereket mindenképpen elkerüljük. A tartó pipetta fogását megszüntetjük és a PZD pipettára felszúrt embriót óvatosan a tartó pipetta alsó, vagy felső részéhez sűroljuk többször. Mindaddig végezzük a beavatkozást, a felszúrt két pont között, míg nem látszik a zona elvékonyodása.

VIZSGÁLATI IRÁNYOK ÉS CSOPORT

LAH utáni eredmények vizsgálata

A Szent János Kórház Budai Meddősegi Centrumjában 1998. február 28. és 2000. szeptember 10. közötti időszakban 1482 IVF program történt, melyből 655 esetben az in vitro fertilizációt nem követte asszisztált hatching, 827 esetben viszont a program kiegészült lézer asszisztált hatchinggel.

Megvizsgáltuk a klinikai terhességek arányát az embrió transzferre. Monitorizáltuk a transzferált embriókra vonatkoztatott implantációs arányt. Megnéztük a spontán abortuszok számának alakulását, valamint az élveszületési, „take home baby“ arányt.

A LAH csoport eredményeit tovább bontottuk indikációs alcsoportok szerint. A beosztás a következő: az 1. alcsoport: 3 vagy annál több sikertelen IVF program után lévő páciensek, de 35 év alatti női kor, a 2. alcsoport: 35 év feletti nő életkor, 3. alcsoport: 35 év feletti női életkor és 3 vagy annál több sikertelen IVF program.

Lézer (LAH) és mechanikus (AH) hatching eredményeinek összehasonlítása

Ezen időszakban történt lézer asszisztált hatching után elért terhességek és megszületett gyermekek arányát összehasonlítottuk egy korábbi időszakban (1996. április 1. és 1999. február 27) végzett mechanikus hatching eredményességével (114 eset).

Megvizsgáltuk a klinikai terhességek arányát az embrió transzferre és petesejt levételre.

Monitorizáltuk a transzferált embriókra vonatkoztatott implantációs arányt. Megnéztük a spontán abortuszok számának alakulását, valamint az élveszületési, „take home baby“ arányt.

Lézer hatching után megszületett gyermekek nyomonkövetéses vizsgálata

A későbbiekben nemcsak a terhességi sikerarányt vizsgáltuk a lézer beavatkozás után, hanem a megszületett gyermekek egészségi állapotát is folyamatosan követtük. Ez a vizsgálat felöleli (1998. december 2. és 1999. december 31. között) 96 szülésből származó 134 gyermek utánkövetéses vizsgálatát is.

Megnéztük, hogy hányszor történt prenatális kariotípus meghatározás és milyen eredménnyel. Feltártuk a családi anamnézist, vagy az ismert kromoszóma aberráció hordozást dokumentáltuk. A perinatális adatok közül feldolgoztuk a gesztációs kort, a szülés módját, a születési súlyt, a szex arányt, a minor és major rendellenességek meglétét, illetve hiányát és a neonatális problémákat. A vizsgálatot kiterjesztettük a gyermekek egy éves életkoráig. Összehasonlítottuk a lézeres csoport fejlődési rendellenességeinek arányát a normál koncepció során létrejött terhességekével.

A terhességeket a 16. hétig a Budai Meddőségi Centrum orvosai gondozták. A szülések húsz különböző kórházban zajlottak le, de fele (48 eset) a Szent János Kórházban történt. Minden szülésről a szülészeti intézet által kiadott anyai zárójeletést és az újszülött/ek írásbeli dokumentációját begyűjtöttük.

Majd három, hat hónapos és egy éves korban telefon interjút kértünk a szülőktől a gyermekek fejlődésére és esetleges problémáira vonatkozóan. Erre standard kérdőívet alkalmaztunk.

A major malformáció megnevezésére azt a világszerte használt definíciót fogadtuk el, miszerint az élettel összeegyeztethetetlen, műtéti korrekciót igénylő az eltérés.

A minor malformáció ezzel szemben az élettel összeegyeztethető eltérés.

EREDMÉNYEK

Lézer asszisztált hatching végzése utáni eredmények vizsgálata

A vizsgált időszakban 1482 IVF ciklust végeztünk a Szent János Kórház Budai Meddőségi Centrumjában. Ebből 655 történt lézer asszisztált hatching végzése nélkül és 827 pedig LAH-al kiegészített programban.

243 terhesség jött létre (37%) a 655 esetből, ahol nem történt lézer asszisztált hatching. 80 (32,9%) spontán abortusz zajlott le a létrejött terhességekből. Az implantációs arányt 19,9%-nak találtuk. Szülés 163 esetben történt, a take home baby arány 24,9 %. Az átlagos női életkor 33,1 év (21-35).

A LAH csoportban 263 terhesség jött létre, ami 31,8%. 96 terhesség (36,5%) spontán abortusszal végződött. A 167 szülés 20,2 % take home baby arányt jelent. Az átlagos életkor a vizsgált csoportban 33,3 év. A

beültetett embriók átlagos száma 2,8. A beültetett embriókra vonatkoztatott implantációs arány 15,2%.

Ugyanazt a megtermékenyülési arányt találtuk mind a nem-LAH, mind a LAH csoportban (65% embrió/petesejt).

Az 1. alcsoportnál, ahol a LAH indikációja 3, vagy annál több sikertelen IVF, de 35 év alatti női kor volt, 489 IVF/ICSI – ET programot végeztünk, ez az össz. esetszám 59,1%-a (489/827). Átlagosan 7, 3 petesejtet aspiráltak, melynek 66%-a termékenyült meg (PN2), ebből 66,2% ICSI módszer segítségével. Az átlagosan visszahelyezett embriók száma 2,8. Az előzményben átlagosan 3,5 sikertelen IVF próbálkozás szerepelt. A beavatkozás során 177 terhességet igazoltunk, ami 36,2% (177/263). 59 terhesség végződött abortusszal (33,3% - 59/177). 24,1% elveszülés történt (118/479). Az implantációs arány 16,7% (226/1356). Az átlagos életkor 29,7 (22-34).

Az 2. alcsoportnál, ahol a LAH indikációja a 35 év feletti női kor volt, 248 IVF/ICSI –ET programot végeztünk, ez az össz esetszám 30,0%-a (248/827). Átlagosan 5,8 petesejtet aspiráltak, melynek 66,7%-a termékenyült meg (PN2), ebből 63,2% ICSI módszer segítségével. Az átlagosan visszahelyezett embriók száma 2,6. Az előzményben átlagosan 0,9 sikertelen IVF próbálkozás szerepelt.

A beavatkozás során 65 terhességet igazoltunk, ami 24,8% (65/248). 26 terhesség végződött abortussal (40,0% - 26/65). 15,7% élveszülés történt (39/248). Az implantációs arány 12,8% (85/665). Az átlagos életkor 38,0 (35-47).

Az 3. alcsoportnál, ahol a LAH indikációja 3 vagy annál több sikertelen IVF, és 35 év feletti női kor volt, 90 IVF/ICSI – ET programot végeztünk, ez az összes esetszám 10,9%-a (90/827). Átlagosan 6,5 petesejtet aspiráltak, melynek 65,4%-a termékenyült meg (PN2), ebből 64,2% ICSI módszer segítségével. Az átlagosan visszahelyezett embriók száma 2,8. Az előzményben átlagosan 4,3 sikertelen IVF próbálkozás szerepelt. A beavatkozás során 21 terhességet igazoltunk, ami 23,3% (21/90). 11 terhesség végződött abortussal (52,4% - 11/21). 11,1% élveszülés történt (10/90). Az implantációs arány 11,7% (31/265). Az átlagos életkor 38,8 (35-46).

Lézer és mechanikus hatching eredményeinek összehasonlítása

A 114 esetben végzett mechanikus hatching eredményeként 29 terhesség jött létre, amely 25,4% volt. Ebből 10 spontán abortussal (34,5%), 19 pedig szüléssel végződött. Tehát a take home baby arány 16,6% (19/114). Az átlagos életkor a vizsgált csoportban 31,1 év. A beültetett embriók átlagos száma 3,1. A beültetett embriókra vonatkoztatott implantációs arány 11,6%. Szemben a LAH csoporttal ahol 263 terhesség jött létre, ami 31,8%. Ebből 96 terhesség (36,5%) spontán abortussal végződött. A 167 szülés 20,2% take home baby arányt felel meg.

Az átlagos életkor a vizsgált csoportban 33,3 év. A beültetett embriók átlagos száma 2,8. A beültetett embriókra vonatkoztatott implantációs arány 15,2%.

LAH után született első 134 gyermek nyomonkövetéses vizsgálata

Tanulmányunkban 134 gyermeket vizsgáljuk meg, akik 96 szülésből származnak. Nem végeztünk előzetes kromoszóma szűrést a pácienseknél az IVF program megkezdése előtt, de rákérdeztünk már ismert genetikai problémákra, pozitív családi háttérre vagy a szülők által hordozott, ismert kromoszóma aberrációra.

76 esetben történt amniocentezis a prenatális kariotípus meghatározására, ami 79,1% az összes terhesség függvényében és 56,7% a megszületett gyermekek számára vetítve.

A 96 szülés 384 indított ciklus (25%) során jött létre. A 384 indított ciklusból 119 esetben regisztráltunk terhességet (30.9%). 23 terhesség végződött spontán abortussal (19.3%).

117 esetben végeztük a lézer asszisztált hatchinget olyan esetben ahol a női kor magasabb volt, mint 35 év (117/384, 30.5%). A terhességi arány ezen indikációjú csoportnál 21.4% (25/117) volt, a terhességi veszteség pedig 12% (3/25). 22 élveszülés zajlott le a 117 esetből (18,8%). Az implantációs arány 10,6%. Az átlagos női életkor 37,0 (35-44).

183 olyan pácienset tartalmazott mintánk, ahol minimum 3 sikertelen embrió transzfer történt az előzményben, ami a teljes beteganyag 47,7%-t (183/384) tette ki.

A terhességi sikerarány itt 42,6% (78/183), a spontán vetélési arány 21,8% (17/78) volt. 33,3%-ban jött létre élveszülés (61/183). Az implantációs arány 21,1%. Az átlagos női életkor 32,1 év (25-35).

A 384 esetből 84 volt olyan akinél mind a két előbbi indikáció (35 év feletti kor, és háromnál több sikertelen embrió transzfer) megtalálható volt. A terhességi arány itt 19%-s (16/84), a terhességi veszteség pedig 18,7%

(3/16). 13-szor történt élveszülés a 84 ciklusból (15,5%). Az implantációs arányt 9,2%-nak találtuk. Az átlagos női életkor pedig 38,5 év (36-44).

Az elvégzett ciklusokban az embrió transzfer arány 98,5% (384 / 390). Prenatális kariotípus meghatározás 56,7%-ban (76 / 134 - 56,7%) történt az újszülöttek számára vonatkoztatva. Két strukturális kromoszóma eltérést (2,6%) találtunk a 76 kariotípus meghatározásból, de mindkét esetben ez megtalálható volt legalább a szülők egyikénél.

Mindkét esetben kiegyensúlyozott transzlokációt találtunk klinikai jelentőség nélkül.

2 major kongenitális malformáció (2,08%, 2/96) fordult elő anyagunkban, ami műtéti korrekciót igényelt az első nyomonkövetés eredményeként.

Az első esetben speciális fejlődési rendellenesség volt (Fallot- tetralógia gyermek meghalt a perinatális periódusban.

A második esetben (ventricularis septum defectus), melyet műtéttel megoldottak, a gyermek jól fejlődik.

Az utankövetés második periódusában még egy major malformáció derült ki (urether stenosis unilateralis cum hydronephrosis). A műtéti korrekció sikerrel járt, hathónapos korában a gyermek egészségesnek bizonyult.

Összesítve tehát a major malformációs arány 3,1% (3 / 96).

A vizsgálati periódusban a Szent János Kórház Szülészeti Osztályán 863 szülésből 894 gyermek jött világra. 28 major malformációt (27/863 – 3,1%) regisztráltak, ami megegyezik a mi vizsgálati anyagunkban talált aránnyal.

Anyagunkban 5 minor malformációt regisztráltunk (5,2% - 5/96), amelyek a következők voltak: Unilateralis pes equinovalgus, pitvari septum defectus (2 eset), cryptorchismus, congenitalis anyajegy. Kilenc egyéb minor malformáció derült ki a telefonon végzett kérdések alapján (Pyelum duplicatum, csípőficam, Torticollis (2 eset), pitvari septum defectus (2 eset), nyitott Botall vezeték (3 eset) és ventricularis septum defectus.

61 egyes (63,5%), 32 iker (33,3%) és 3 trigemini (3,12%) terhesség volt a 96 szülésből. Három esetben monozygotikus iker (3/35 - 8,6%) született.

A limitált számú gyermek vizsgálata azt mutatja, hogy nem magasabb a kongenitális malformáció előfordulási aránya a lézer asszisztált hatching végzése után. A közeljövőben azonban szeretnénk nagyobb beteganyagot is elvégezni a vizsgálatokat.

MEGBESZÉLÉS

Jó pár tanulmány beszámol az asszisztált hatching eltérő módszereinek használatának hatékonyságáról a pácienseknek különböző csoportjaiban. Főleg a rossz prognózisú, emelkedett korú, a stimuláció során nagyobb mennyiségű FSH készítményt kapott, az előzményekben sikertelen implantációval járt programok utáni, illetve vastag zona pellucidával rendelkező páciensek esetén. Asszisztált hatching javasolt kokultúra és fagyasztás után felengedett embriók transzfere előtt.

Az általunk vizsgált csoportban a megszületett 134 gyermekből 3 esetben (2,2%) fordult elő major malformáció lézer asszisztált hatching végzése után. Az in vitro kultúrában nevelt embriók tokjának meghasítása nem mutatott látható károsodást a lézer beavatkozás következtében. Ezért a hatching kétségtelenül alkalmas lehet az IVF-ET eredményének javítására. Az előző eredmények azt mutatják, hogy azon nők esetében, ahol rossz megtapadási eséllyel rendelkező embriók képződnek segíthet a ZP pellucida megnyitása kevéssel a transzfer előtt végezve. Ugyanebben az időszakban született 894 hagyományos teherbeesést követően a major malformáció aránya (3,0%) volt kórházunkban. Ebből az következik, hogy sem a

malformáció arányában, sem a kromoszóma aberráció tekintetében nem találtunk eltérést a két csoport között. Úgy gondoljuk, hogy a non-contact módszerrel alkalmazott dióda lézer használata nem veszélyes az utódok szempontjából. A módszer biztonságos, gazdaságos, kényelmes technika összehasonlítva az emberi asszisztált reprodukciós technikákban ismert asszisztált hatching módszerekkel.

A metódus biztonságát alátámasztják a meghasított tokú embriókból fejlődő egészséges utódok léte.

Több okból is javaslom a LAH alkalmazását. Mechanikus hatching esetén az embrió a beavatkozás kivitelezése miatt jóval hosszabb ideig van kitéve a nem optimális körülményeknek és a hatching eljárás potenciálisan növeli az embrió sérülésének lehetőségét.

Ugyanakkor a lézer asszisztált hatchig végzése minimalizálja az időt, amit az embrió az inkubátoron kívül tölt el, hiszen a lézer operációs rendszer az embrió érintésének elkerülésével dolgozik, nem kell mikromanipulációs eszköz használata a beavatkozás kivitelezéséhez, ami önmagában hordozza az embriósérülés lehetőségét. A keletkezett lyuk mérete elég nagy ahhoz, hogy a tokból történő kiszabadulás a megfelelő időben megtörténjen, de nem olyan nagy, hogy blasztoemer veszteséghez vezessen az embrió transzfer során.

A DNS (fény elnyelése 300 nm) sérülése mindenképpen elkerülendő. Az 1480 nm hullámhosszon működő dióda lézer ezért ideálisnak mondható, hiszen hullámhossza jóval meghaladja a DNS elnyelési hullámhosszát, a víz nem abszorbeálja, viszont jól abszorbeálják a ZP glikoproteinjei.

Végezetül a módszer igen precíz ZP megnyitást tesz lehetővé, ami tökéletesen kontrolálható, reprodukálható.

Az IVF technikájának fejlődése ellenére, még mindig alacsony implantációs arány a jellemző, ami főként a korral és a többszöri sikertelen próbálkozással van kapcsolatban.

BLASZTOCISZTA KULTÚRA

ANYAG ÉS MÓDSZER

A Szent János Kórház Budai Meddősegi Centrumában 1999. február óta Magyarországon elsőként alkalmaztunk szekvenciális táptalajt az embriók 5-6 napig történő tenyésztéséhez, blasztozisza stádiumig.

Páciens szelekció blasztozisza tenyésztésre

A ciklus harmadik napján mért bazális FSH értéke 15 IU/L alatt legyen

A női kor nem lehet több mint 45 év

Normális méhüreggel rendelkező pácienseknél

Megfelelő minőségű sperma paraméter IVF-re, vagy ICSI-re

Ne legyen kontraindikációja a terhességnek

Minimum 10 db 12 mm-nél nagyobb tüsző a hCG adás napján

A stimulációra jól válaszoló páciens

Fiatal női életkor

Megfelelő számú zygóta, (min. 4 db.)

A harmadik napon megfelelő fejlettségű és minőségű embriók

A páciensek átlagéletkora 31,4 év volt (22-42).

A petesejtek megtermékenyítése az esetek 35%-ban inszeminációval, 65%-ban ICSI módszerrel végeztük.

A petesejt leszívása a hCG injekciót követően 35 órával történt, transzvaginális ultrahangvezérelt folliculuspunkcióval.

Szövettenyésztés

A petesejteket a felkeresés után Nunclon (négylyukú) steril, nem toxikus, nem pirogén szövettenyésztő edénybe, 1 ml IVF médiumba (Vitrolife, Svédország) helyeztük, melyet egy éjszakán át equilibráltunk 37°C-on, 5% CO₂ koncentráción.

A petesejtek megtermékenyítése vagy petesejtenként 100000 jól mozgó spermiummal (tradicionalis IVF), vagy ICSI módszerrel történt.

A petesejtek megtermékenyülését 15-18 órával az inszemináció után ellenőriztük, invert mikroszkóp segítségével (Nikon).

A petesejt vételtől a megtermékenyülés elbírálásáig a szövettenyésztés IVF (Vitrolife) táptalajban történt, 50 µl-s cseppekben, csoport kultúrában (maximum négy zigóta/csepp), 500 µl olajjal (Ovoil, Vitrolife) lefedve, 37°C-os 5-6% CO₂ tartalmazó termosztátban, 6001-s Petri csészében (Falcon).

A két pronukleusszal rendelkező zigótákat tenyésztettük csak tovább G 1.2 (Gardner féle) táptalaj (Vitrolife) 50 µl-s cseppjében, csoport kultúrában, 500 µl olajjal fedve, 6001-s Petri csészében (Falcon). Az áthelyezésnél két mosócseppet használtunk, mielőtt a zigótákat a kultúrcseppbe helyeztük.

Az embriók osztódását és morfológiáját a második napon nem vizsgáljuk.

Az embrió fejlődés vizsgálatának következő időpontja a petesejt vételt követő harmadik nap reggele volt (tehát a hagyományos metódusokban alkalmazott 24 órás ellenőrzések helyett itt elegendő a 48 órás is). Ekkor a

megfelelő fejlettségű és minőségű embriók (legalább 6-8 sejtes stádium) tenyésztését G 2.2 (Vitrolife) táptalajban folytattuk, 50µl-s cseppekben, két mosócseppel, csoport kultúrában, olaj felülréteggel. A G 2.2 táptalajt minimum 6 órán át equilibráltuk 37°C-on, 5% CO₂ koncentrációban.

A petesejtvételt követő ötödik napon a blasztocisztákat a Gardner féle rendszer szerint értékeltük, invert mikroszkóppal és 2-3 blasztocisztát embrió transzferre kiválasztottunk.

A blasztociszták szelekciójának alapja az inner cell mass megléte és elkülönültsége volt, valamint az, hogy a trophoctoderm sejtek mennyisége sok és kicsi legyen, valamint folyamatos elhelyezkedésük. Amennyiben kiterjedt blasztociszta fejlődött, ezt mindenképpen beválasztottuk a transzferálható blasztociszták közé, elsőbbséggel.

A legideálisabb blasztociszta, melynek legnagyobb a megtapadási valószínűsége a következő ismérvekkel rendelkezik: egyosztatú, nagymértékben üregesedett vagy kiterjedt blasztociszta az ötödik napra, ahol jól elkülöníthető az ICM, szorosan felfekvő trophoctoderm (TE) réteg látható, sarló alakú sejtekkel, vékony a zona pellucida, magas a teljes sejt szám (TCN) ha áttekintjük a blasztociszta összes síkját a felszíntől a teljes mélységig.

A blasztociszták transzfere G 2.2 táptalajból történt.

A transzferált blasztocisztáknál nem alkalmaztuk a teljes zona lebontást.

Az embrió transzfereket Frydman, vagy TDT katéterrel végeztük.

A petesejt vételt követő 14. napon szérumbeta hCG vizsgálattal győződünk meg a terhesség létrejöttéről. Transzvaginális ultrahang vizsgálatot a petesejtvétel utáni 21. napon végezték.

EREDMÉNYEK

Az 593 IVF ciklus során összesen 4959 petesejtet (átlagosan 8,4) aspiráltunk, melyek közül 4215 volt érett (MII.) állapotban (85%).

A megtermékenyülési arány az MII. petesejtekre vonatkoztatva 76% lett (3191). Triploid megtermékenyülés 1%-ban fordult elő.

Morula, blasztociszta állapotig az osztódási arány 58,7% volt.

Az 574 embrió transzfer során összesen 1263 blasztocisztát ültettünk vissza (átlagosan: 2,2).

76 esetben az embrió transzfert a zigóták alacsony száma miatt a negyedik napon végeztük (13,2%). 25 klinikai terhesség után (32,9%), 17 szülés történt (22,4%).

472 esetben történt az embrió transzfer az ötödik napon (82,2%). 189 terhesség jött létre (40,0%). Ezt 132 esetben követte szülés (28%).

26 esetben pedig a hatodik napon (4,5%), 11 klinikai terhességet regisztráltunk (42,3%) melyből 3 végződött szüléssel (11,5%).

19 esetben egyáltalán nem fejlődött morula illetve blasztociszta (3,2%), ezért embrió transzfert nem végeztünk.

Az 574 esetből 225 alkalommal jött létre klinikai terhesség (39,2%).

Szív működés 277 magzat esetében volt ultrahanggal látható.

Az esetek 32,4%-a végződött spontán abortusszal (73/225).

Az esetek 7,6%-ban morula stádiumban történő embrió transzfert végeztünk (44 eset), mely 5 terhességet (11,4%) eredményezett.

A létrejött terhességek közül 110 egyes (72,4%), 40 kettes (26,3%) és 2 hármas (1,3%) terhesség jött létre.

Az implantációs rátát 22,6%-nak találtuk.

MEGBESZÉLÉS

Ismert tény, hogy a korai embrió fejlődési státuszának megfelelő környezet a petevezető, nem pedig a méh, amely a befogadó szerepre éretlen és nem biztosítja a megfelelő tápanyag szükségletet. A méhbe természetes körülmények között az embrió csak a kompaktálódás után jut be. Bavister patkány kísérletei egyértelműen bizonyították a korai embrió illetve morula vagy blasztociszta méhbe való helyezése után elért terhességi eredmények. Az öt napos tenyésztés során azon embriók amelyeknek fejlődési potenciálja alacsony kiválaszthatók és kizárhatók Bolton és Dawson szerint, hiszen az embrionális genom aktiválódása megkezdődik illetve néhány kromoszómáisan abnormális embrió nem fejlődik tovább.

Szekvenciális szérum mentes táptalaj használata nem az egyetlen út arra, hogy a zygótákat blasztociszta állapotig neveljük nagy hatékonysággal. Elkerülhető a szérum albuminnal, esetleg állati sejtvonallal bevitt infekciók lehetősége. Az így létrejött blasztocisztáknak magasabb az implantációs aránya, mint a korai embrióknak, így emelhető az IVF sikeressége. A magasabb implantációs arány miatt csökkenthető az embrió transzferre kerülő embriók száma, így csökken a hármas és többes terhességek aránya.

GYAKORLATI KÖVETKEZTETÉSEK

LÉZER ASSZISZTÁLT HATCHING

Az asszisztált hatching nem emeli a terhességi és implantációs arányt, ha a páciens 38 év alatti és az első IVF programjáról van szó.

De a LAH emeli a terhességi és implantációs sikerarányt többszöri sikertelen IVF után.

A LAH előnye nem tisztázott még teljesen, az emelkedett anyai kor, a vastag zona pellucida és a fagyasztás után felengedett embriók esetén.

A lézer asszisztált hatching leegyszerűsíti, felgyorsítja, és biztonságosabbá teszi a blasztomer biopszia végzését.

Lézer asszisztált hatching végzése után nem találtunk alacsonyabb embrió továbbfejlődési arányt a Szent János Kórház Budai Meddősegi Centrumának anyagában.

A lézer asszisztált hatching végzésekor elkerüljük a fizikai érintését az embriónak, nem tesszük ki toxikus hatásnak. Az eljárás könnyen kivitelezhető, időkímélő, nagy hatékonyságú és könnyen reprodukálható módszer.

A LAH költségkímélő, nem szükséges hozzá hosszú évek embriológiai gyakorlata.

A megszületett gyermekek egyedülálló utánvizsgálata egyértelműen bizonyítja a LAH módszer veszélytelenségét, biztonságát.

BLASZTOCISZTA KULTÚRA

A Gardner féle szérum mentes szekvenciális táptalajjal biztonságosan lehet életképes embriókat létrehozni, amennyiben megfelelő környezetet tudunk biztosítani az embrió fejlődéséhez.

A hosszú tenyésztési idő alatt jobban lehet szelektálni az embrió transzferre kerülő embriókat, mivel a genetikailag hibás embriók túlélése valószínűtlenebb.

Természetes körülmények között az osztódó és fejlődő embrió az ötödik napon (vagyis a ciklus 20. napján) jut a méhüregbe, amikor is a méh nyálkahártyájának fejlettsége és a blasztociszta fejlettsége szinkron állapotban van. Így ha az ötödik napon blasztociszta állapotban juttatjuk az embriót a méhüregbe, sokkal jobb eredményeket várhatunk, mintha két, három napos embriót juttatnak oda, amikor is a méh nyálkahártya állapotának és az embrió fejlettségének aszinkronitása áll fent.

Blasztociszta transzfer esetén nagyobb valószínűséggel elkerülhető az abnormális szülői genom öröklése ICSI után.

A blasztociszta egyszerű mikroszkópos vizsgálatával megfigyelhető jellemzők alapján kiválogatható az életképebb embrió.

Több idő áll rendelkezésre a preimplantációs genetikai vizsgálat kivitelezésére.

A fagyasztás – felengedés után több idő marad az embrió továbbfejlődésének ellenőrzésére.

A blasztociszta kultúra módszere csökkenti az idő intervallumot az embrió továbbfejlődés és a nyálkahártyába való implantáció ideje között, és ezáltal csökken a nem kívánatos faktorok hatása az embrió-szülő relációban.

A TÉMÁHOZ KAPCSOLÓDÓ TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉG JEGYZÉKE

ELŐADÁSOK

1. KONC J, **KANYÓ K**, ZSOLNAI CS. (1994) Transvaginal-transmyometrial embryo transfer under ultrasound guidance: Towako Method. IV.th World Congress of ISUOG, Budapest.
2. KONC J, **KANYÓ K**, ZSOLNAI CS. (1995) In vitro fertilizációval szerzett tapasztalataink polycystas ovarium szindrómánál. IVF Workshop, Pécs.
3. **KANYÓ K**, KONC J, ZSOLNAI CS. (1995) Our policy for prevention of ovarium hyperstimulation syndrome. "Ovarium Stimulation and Hyperstimulation" the Satellite Symposion of the IX.th Word Congress on IVF and Assisted Reproduction, Budapest.
4. KONC J, **KANYÓ K**. (1995) Experiences with transvaginal-transmyometrial embryo transfer under ultrasound guidance, Towako-method. Magyar Bajor Baráti Társaság , Tudományos Ülése, München.
5. **KANYÓ K**. (1995) MiniVidas alkalmazása egy IVF központban. Diagnosticum Rt. Laboratóriumi termékbemutató és symposium, Budapest.
6. **KANYÓ K**, KONC J, ZSOLNAI CS, HUNKA R.(1996) Az in vitro fertilizáció eredményességének javítása harmadik napos embrió transzferrel. " Családcentrikus szülészet " I. Kongresszusa, Budapest.
7. **KANYÓ K** és munkatársai (1996) IVF eredményeink javítása III. napos embryo transzferrel. " Az asszisztált reprodukció aktuális kérdései Magyarországon " II. Symposium and Workshop, Pécs.

8. KONC J, **KANYÓ K**. (1997) Törekvéseink (filozófiánk) az IVF sikerességének javítására a micromanipuláció indikációjának kiterjesztésével és a "halasztott" embryotranszfer alkalmazásával . Az asszisztált reprodukció időszerű kérdései, III. Symposium és Workshop, Pécs.
9. **KANYÓ K**, KONC J. (1997) A micromanipuláció kiterjesztésének és a késői embryotranszfer alkalmazásának embryologiai szempontjai. Az asszisztált reprodukció időszerű kérdései, III. Symposium és Workshop, Pécs.
10. **KANYÓ K**, KONC J, KOVÁCS J. (1997) Micromanipuláció a Szent János Kórházban (Videofilm), Noszkay emlékszimposium, Budapest.
11. KONC J, **KANYÓ K**, KOVÁCS J, MÁRTA E, HUNKA R. (1998) Az IVF eredményessége és a micromanipuláció. Magyar Nőorvos Társaság, XXVI. Nagygyűlése, Pécs.
12. **KANYÓ K**, KONC J, KOVÁCS J: (1998) Áthatolás a zona pellucidán, Videofilm, 8 perc. Magyar Nőorvos Társaság, XXVI. Nagygyűlése, Pécs.
13. KONC J, **KANYÓ K**. (1998) Assisted hatching by non-contact laser. Bajor-Magyar Baráti Társaság, Budapest Visegrád.
14. KONC J, **KANYÓ K**. (1998) Laser hatchinggel szerzett első magyarországi tapasztalatok. Az asszisztált reprodukció időszerű kérdései, IV. Symposium, Pécs.
15. **KANYÓ K**, KOVÁCS J, KONC J, MÁRTA E.(1998) Terhesség cryoconservált hereszövetből kinyert spermiummal, Az asszisztált reprodukció időszerű kérdései, IV. Symposium, Pécs.

16. **KANYÓ K**, KOVÁCS J, KONC J. (1998) Mikromanipuláció a petesejten és embrión. Szent János Kórház Centenárium Tudományos Ülések VIII., Budapest.
17. KONC J, KOVÁCS J, **KANYÓ K**. (1998) A LASER szerepe az embriológiában Szent János Kórház Centenárium Tudományos Ülések VIII., Budapest.
18. **KANYÓ K**. (1999) Recombináns FSH és az embrió minőség, SERONO Szimpózium: Új Korszak Kezdeté a Meddőség Kezelésében, Budapest.
19. KONC J, **KANYÓ K**. (1999) Puregon administration in IVF cycles, at low responders, above the age of 37 years. 11th World Congress on In Vitro Fertilisation and Human Reproductive Genetics, SYDNEY, Abstract: O-054.
20. **KANYÓ K**, KONC J. (1999) Non contact laser hatching combined with day 3 embryo transfer. 11th. World Congress on In Vitro Fertilisation and Human Reproductive Genetics, SYDNEY, Abstract: O-100.
21. **KANYÓ K**, KONC J. (1999) Lézer hatchinggel szerzett tapasztalataink. MART II. Nemzeti Kongresszusa, Debrecen.
22. KONC J, **KANYÓ K**, MÁRTA E, ZEKE J. (1999) A 40 év feletti IVF programja. Jelen lehetőségeink és korlátaink mindennapi gyakorlatunkban. Az Asszisztált Reprodukció időszerű kérdései, V. Symposium, Pécs.
23. **KANYÓ K**, KONC J, MÁRTA E, ZEKE J. (1999) Blastocysta transzferrel szerzett első tapasztalataink. Az Asszisztált reprodukció időszerű kérdései, V. Symposium, Pécs.
24. KONC J, **KANYÓ K**. (1999) IVF above forty. V. Bajor-Magyar Baráti Találkozó - szimpózium, FERRING, Bad Reichenhall.
25. **KANYÓ K**, KONC J. (1999) First experiences obtained by blastocyst transfer. V. Bajor-Magyar Baráti Találkozó - szimpózium, FERRING, Bad Reichenhall.
26. **KANYÓ K**, KONC J. (2000) Comparison of the non-contact laser hatching's result with the mechanical hatching's result. VIth International Symposium on Assisted Reproduction, Pécs.
27. **KANYÓ K**, KONC J. (2000) A follow-up study children born after non-contact laser assisted hatching at 96 deliveries, 134 babies. 16th Annual Meeting of the ESHRE, Bologna, Italy, Abstract: O-156.
28. **KANYÓ K**, KONC J. (2000) First hungarian Pregnancies-Deliveries after ICSI using originally unmoving spermatids obtained from cryopreserved testicular tissue. XVI. FIGO World Congress, Washington DC, USA., Abstract: FC4.16.02.
29. KONC J, **KANYÓ K**. (2000) Mechanical or Laser Hatching ? XVI. FIGO World Congress, Washington DC, USA. , Abstract: FC3.01.04.
30. MÁRTA E, KONC J, **KANYÓ K**, ZEKE J, ÚJVÁRI E. (2001) Dupla embrió transzferrel szerzett első hazai tapasztalatok. Családcentrikus Szülészet III. Kongresszusa, Salgótarján.
31. **KANYÓ K**, KONC J, MÁRTA E, ZEKE J. (2001) A lézer szerepe a mikromanipulációs eljárásokban. MART III. Nemzeti Kongresszusa, Visegrád.
32. **KANYÓ K**. (2001) Három év alatt szerzett tapasztalataink a lézer mikromanipuláció alkalmazásával. Az asszisztált reprodukció időszerű kérdései, VII. Symposium, Pécs.

33. KONC J, **KANYÓ K.** (2001) Investigations on Double embryo transfer. The 17th World Congress on Fertility and Sterility, Melbourne, Australia, Abstract: page: 163.
34. **KANYÓ K,** KONC J. (2001) Follow-up study after non-contact laser hatching. The 17th World Congress on Fertility and Sterility, Melbourne, Australia, Abstract: page: 49.

POSZTEREK

1. **KANYÓ K,** KONC J. (1994) Mini Vidas rendszer használata in vitro fertilizációs ciklusokban és a betegek kivizsgálásában. Magyar Nőorvos Társaság XXV. Nagygyűlése, Debrecen.
2. **KANYÓ K,** KONC J. (1995) Harmadik napos embrió transzfer. "Az asszisztált reprodukció aktuális kérdései", MART I. Nemzeti Kongresszusa, Budapest.
3. **KANYÓ K,** KONC J, MÁRTA E, HUNKA R. (1996) ICSI from frozen - thawed sperm. ESHRE Campus'96, " Novel Trends in Reproductive Medicine ", Budapest.
4. MÁRTA E, **KANYÓ K,** KONC J, KOVÁCS J, ZEKE J, KRISTON R, FENYVESI B (2001) TESE-ICSI programunk eredményessége. MART III. Nemzeti Kongresszusa, Visegrád.
5. ELEKES T, **KANYÓ K,** SZABÓ J, POLGÁR Z, KONC J. (2001) Dual Color FISH alkalmazása a praeembryonalis aneuploidiák és a nemhez kötött kórképek praeimplantációs szűrésében. MART III. Nemzeti Kongresszusa, Visegrád.
6. J. KONC, **K. KANYÓ:** Effect of double embryo transfer on the results. Buenos Aires, Argentina, 2002. márc. 16-19. 12th World Congress on In Vitro Fertilization and Molecular Reproduction
7. **K. KANYÓ,** J. KONC: An investigation of the safety of laser assisted hatching (follow up study). Buenos Aires, Argentina, 2002. márc. 16-19. 12th World Congress on In Vitro Fertilization and Molecular Reproduction
8. A. TÖRÖK, F. KILÁR, **K. KANYÓ,** M. REZELI, B. VILÁGHY: The electrophoretic patterns of follicular fluid and serum from woman pre-treated for IVF. Buenos Aires, Argentina, 2002. márc.

IDÉZHETŐ ABSTRACT

1. **KANYÓ K**, KONC J. (2000) A follow-up study children born after non-contact laser assisted hatching at 96 deliveries, 134 babies. 16th Annual Meeting of the ESHRE, Bologna, Italy, Abstract: O-156.

KÖZLEMÉNYEK

1. KONC J, **KANYÓ K**. (1995) Transvaginális-transmyometriális embryo transfer (Towako módszer). Magy Nőorv L; 58 (3): 211-213.
2. **KANYÓ K**, KONC J. (1996) Sperma kezelési módszerek összehasonlítása in vitro fertilizációs ciklusoknál. Magy Nőorv L; 59 (3): 189-192.
3. KONC J, **KANYÓ K**. (1998) Polycystás ovariumra utaló ultrahang lelet és az in vitro fertilizáció. Magy Nőorv L; 61 (1) : 46-50.
4. **KANYÓ K**, KONC J, KOVÁCS J, MÁRTA E. (1999) Szülés kriokonzervált hereszövetből kinyert mozdulatlan spermiummal végzett ICSI-t követően (Esetismertetés). Magy Nőorv L; 62 (4):257-259.
5. ZEKE J, **KANYÓ K**, BALOG I, KONC J, LINTNER F. (2001) Adnextorsio IVF-ET során létrejött terhességeknél. Magy Nőorv L; 64 (6), 447-449.
6. **KANYÓ K**, KONC J. (2001) Investigations on Double embryo transfer. IFFS 2001 Selected Free Communications, Melbourne,

- (Australia), Monduzzi Editore (International Proceedings Division), 169-173.
7. **KANYÓ K**, KONC J. (2001) Follow-up study after non-contact laser hatching. IFFS 2001 Selected Free Communications, Melbourne, (Australia). Monduzzi Editore (International Proceedings Division), 153-157.
 8. **KANYÓ K**, KONC J. (2002) Első hazai tapasztalatok lézerrel végzett hatchinggel. Magy Nőorv L; 65 (1), 3-5.
 9. REZELI M, VILÁGHY B, KILÁR F, **KANYÓ K**, TÖRÖK B, TÖRÖK A. (2002) Significant differences in capillary electrophoretic patterns of follicular fluids and sera from woman pre-treated for in vitro fertilization. J Biochem. Biophys. Methods; 53, 151-156. IF: 1,218
 10. **K. KANYÓ**, J. KONC: A follow-up study of children born after diode laser assisted hatching. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology (közlésre elfogadva , 2003.) IF: 1,806
 11. **K. KANYÓ**, J. KONC, L. SOLTI, S. CSEH: Assisted Reproductive Research: Laser assisted hatching and spindle detection (Spindle View Technique). Acta Veterinaria Hungarica (közlésre elfogadva, 2003. szeptember) IF: 0,5